

Thesis AMSTERDAM 1908

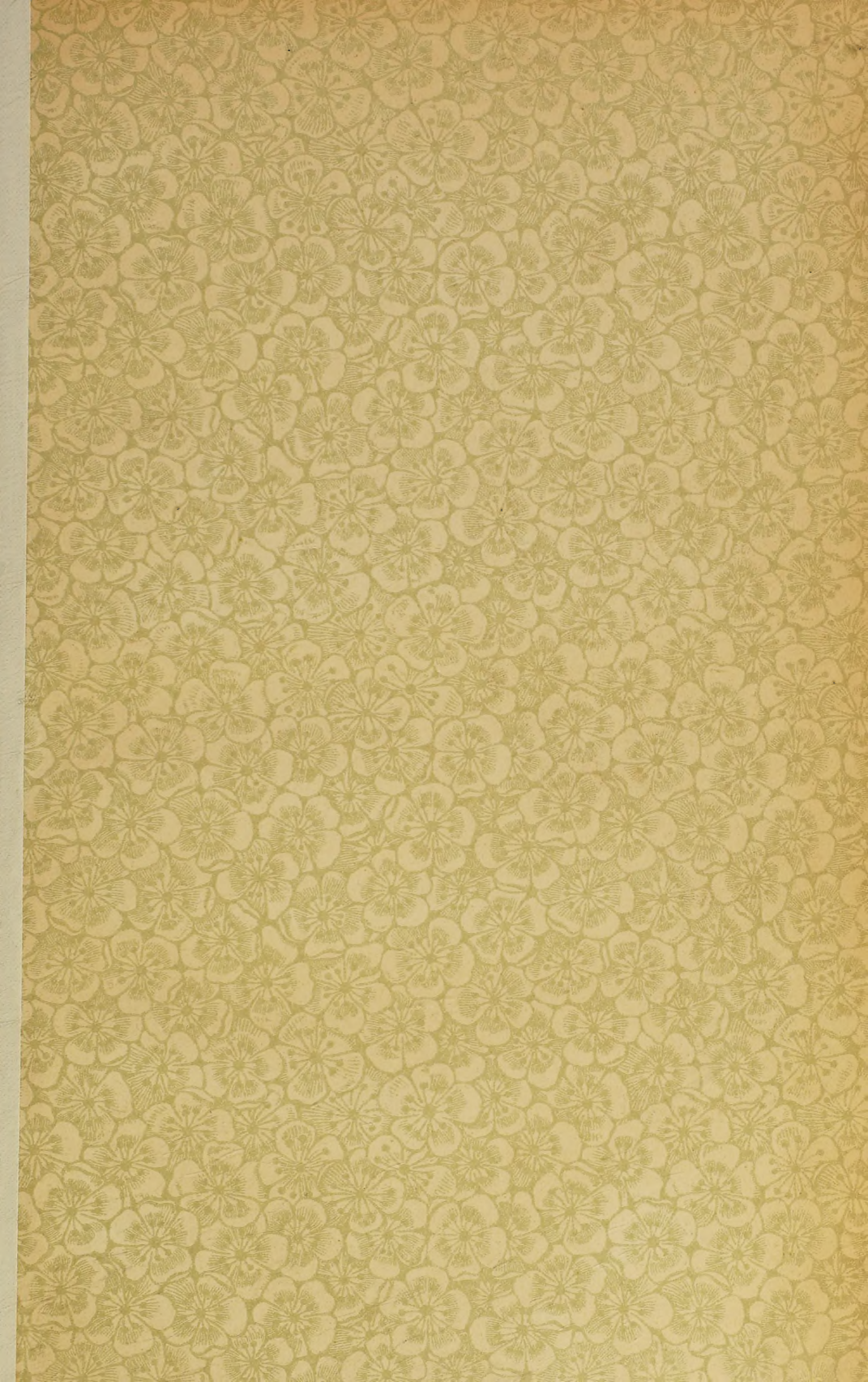
PHAGOCYTOSE

EN

OPSONINEN

J. G. SLEESWIJK





4431

OVER DE OORZAKEN DER PHAGOCYTOSE

-:- EN OVER WEZEN, OORSPRONG -:-

-:- EN WERKING DER OPSONINEN -:-



OVER DE OORZAKEN DER PHAGOCYTOSE EN OVER WEZEN, OORSPRONG EN WERKING DER OPSONINEN

ACADEMISCH PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DEN GRAAD VAN

DOCTOR IN DE GENEESKUNDE

AAN DE UNIVERSITEIT VAN AMSTERDAM

OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS

PROF. DR. C. PH. SLUITER, HOOGLEERAAR

IN DE FACULTEIT DER WIS- EN NATUURKUNDE

IN HET OPENBAAR TE VERDEDIGEN IN DE AULA

DER UNIVERSITEIT, OP DINSDAG 7 APRIL 1908,

DES NAMIDDAGS TE 4 UUR DOOR

JAN GERARD SLEESWIJK

ARTS, GEBOREN TE AMSTERDAM

AMSTERDAM 1908. — BOEK- EN KUNSTDRUKKERIJ
VOORHEEN ROELOFFZEN—HÜBNER & VAN SANTEN



AAN MIJNE OUDERS

Het is mij een voorrecht, deze gelegenheid te kunnen aangrijpen, om aan allen van wie ik bij mijne studie aan de Amsterdamsche Universiteit onderwijs heb mogen genieten, daarvoor dank te zeggen.

In 't bijzonder ook aan U, Hooggeleerde SALTET, voor Uwe bereidwilligheid om als mijn Promotor op te treden, en voor de belangstelling, waarmede gij van den inhoud van mijn proefschrift kennis naamt en mij met Uwe raadgevingen daarbij tot steun waart.

Naast METCHNIKOFF, die de directe aanleiding was tot mijne studie over dit onderwerp, en LEVADITI, die mij in de geheimen van het phagocytoseproces inwijdde, is vooral mijn dankbaarheid groot voor U, Hooggeleerde BORDET, voor de gastvrijheid, mij in Uw laboratorium verleend. Na de bij U opgedane ondervinding acht ik het een buitengewoon groot voorrecht, dat ik ook in de toekomst langeren tijd onder Uwe leiding zal mogen arbeiden.

INHOUD.

Hoofdstuk.	Bladz
INLEIDING	I
I. DE EXPERIMENTEELE GRONDSLAGEN VAN DE LEER DER OPSONINEN	9
II. DE LEER DER BAKTERIOTROPINEN.....	23
III. ENGELSCH E ONDERZOEKINGEN OVER EIGENSCHAPPEN EN CONSTI- TUTIE DER OPSONINEN.....	37
IV. HET PHAGOCYTAIRE MENGSEL. — BETEEKENIS VAN ELK DER COMPONENTEN. — TECHNIEK.....	56
V. OVER NORMAAL SERUM ALS MILIEU, EN OVER DEN BOUW VAN HET NORMALE OPSONINE	79
VI. OVER IMMUUNSERUM ALS MILIEU, EN OVER DEN BOUW VAN HET IMMUUNOPSONINE.....	105
VII. OVER SPONTAANPHAGOCYTOSE.....	128
LITTERATUUR.....	157

INLEIDING.

»Dans une étude sur l'immunité, il importe de tenir compte de deux facteurs: les humeurs et les leucocytes. Dans le corps de l'animal, ces deux facteurs ne sont jamais séparés.«

DENYS en LECLEF.

De immuniteitsleer staat in het teeken der phagocytose.

Slechts hij die aan onze litteratuur volkomen vreemd is, zou dit kunnen ontkennen. Intusschen zal deze stelling hier nader worden toegelicht en bewezen.

Men zou kunnen vragen: is in de kwart-eeuw die achter ons ligt, sedert Metchnikoff in 1883 en '84 met zijn eerste publicaties voor den dag kwam, de strijd niet steeds gevoerd over de vraag: humoraal of cellulair?

Het is wel zeer opmerkelijk dat, waar het antwoord op deze vraag in algemeen-pathologischen zin reeds vóór de tachtiger jaren door Virchow definitief gegeven scheen, toch op immuniteitsgebied de beslissing nog zoo langen tijd daarna sub judice is gebleven. Niet dat de mannen van de bactericidie der vochten zich niet tot de cellulair-pathologen zouden wenschen te rekenen. Allermintst! Maar zij hebben er zich steeds tegen verzet, en de meest gematigden onder hen aarzelen nog aan te nemen, dat slechts ééne celsoort zou zijn aangewezen voor de verdediging van het organisme tegen mikrobieele invasie.

Virchow zelf (Metchnikoff erkent 't dankbaar) was der phagocytenleer welwillend gezind — en geen wonder. Toch heeft hij nooit werkzaam aan dezen strijd deelgenomen: zijn arbeidsveld, hoe uitgebreid ook, lag elders, en bovendien: hij stamde uit den praebakteriologischen tijd.

Niets ware meer aanlokkelijk dan te trachten in deze inleiding een historisch aperçu te geven van den strijd der meeningen over dit onderwerp. Toch zal ik zulks hier nalaten, daar ik in de volgende hoofdstukken vaak genoeg grepen zal moeten doen uit onze nog zoo korte, doch aan wetenschappelijk gebeuren zoo rijke geschiedenis: de bakteriologen zijn de snelst levenden onder de medische specialiteiten!

Het kan geenszins verwondering baren dat Metchnikoff ook op schrijver dezes, die zich tot het immuniteitsvraagstuk aangetrokken gevoelt, zijn positief-chemotactischen invloed deed gelden.

Zoo vatte ik dan het rijke verschijnsel der phagocytose ergens aan; de vruchten van mijne studie en van mijn onderzoek heb ik in dit proefschrift uiteengezet.

In 1903, bij gelegenheid van het Internationaal Hygiënisch Congres te Brussel, was de strijd levendiger dan ooit. Pfeiffer zelf formuleerde hier scherp het beginsel van de bactericidie der lichaamsvochten, Metchnikoff zelf zette er het begrip der phagocyttaire immuniteit uiteen, beiden handhaafden krachtig de autonomie van elk hunner principes, en ... geen van beiden week.

Het was Wright te Londen, die met Douglas en vele andere medewerkers en navolgers den stoot gaf tot wat ik zou willen noemen: de Engelsch-Amerikaansche opsonische beweging. Hij wist door en voor de kliniek

eene tegelijk kwalitatieve en quantitatieve methode uit te werken, welke ook voor de verdere studie van het phagocytoseproces vruchtdragend zou blijken. Wright's opsoninenleer vormt samen met de Neufeld'sche bacteriotropinentheorie een modern hoofdstuk der immuniteitsleer, dat ons omtrent den invloed van normaal- en immuunsera beide op aard en intensiteit van het phagocytoseproces reeds veel belangrijks heeft geleerd.

Daarnaast was het Bail met de zijnen, die in de opvattingen over den strijd tusschen mikro- en makro-organisme het begrip van de aggressiviteit der mikroben invoerde, en die daarmee een nieuwe infectieleer trachtte te geven, waarin de chemotaxis der leukocyten in positieven of negatieven zin wederom een groote rol speelde.

Wij komen op een en ander nog in extenso terug. Voor 't oogenblik zij er slechts op gewezen, dat de phagocyttaire actie, of liever reactie, opnieuw de levendige belangstelling der onderzoekers is komen vragen, en dat bij de pogingen tot verklaring van het mechanisme dezer verschijnselen de figuur van Metchnikoff weer midden in het strijdperk staat. Dit was het, wat mij in den aanhef dezer inleiding deed schrijven: de immuniteitsleer staat in het teeken der phagocytose.

Toch willen we het onderwerp niets reeds a priori eenzijdig beschouwen. We vragen ons dan af, of met het uitspreken dezer stelling niet eenig onrecht wordt gedaan aan het werk van Ehrlich en zijn school, deels zelfs aan dat van Bordet (voor zoover het de methode der complementbinding geldt), en of deze mannen, door hunne reacties met specifieke antistoffen in de reageerbuis, het immuniteitsvraagstuk niet veeleer in het teeken van het serumonderzoek hebben gebracht?

Het zij verre van mij de waarde te onderschatten

van alles wat het onderzoek van het serum alléén, ook op het gebied der agglutinatie, ons geleerd heeft en ons nog dagelijks leert. Maar hoe komt het dan, dat wij bij de intieme verklaring van de vele nog raadselachtige immuniteitsverschijnselen telkens weer tot de leukocyten onzen toevlucht moeten nemen? De schrijver van „l'Immunité dans les maladies infectieuses” antwoordt ons: „Il n'y a qu'un élément constant dans l'immunité innée ou acquise qui est la phagocytose” 1).

Is hiermede nu voldoende verklaard, waarom de theorie, gebaseerd op dit constante immuniteitselement, trots tallooze aanvallen — maar dan ook gelouterd — is blijven standhouden, en zelfs (de teekenen der tijden wijzen er op) wederom veld wint?

Het wil mij voorkomen, dat de belangrijkste oorzaak voor de vruchtbaarheid der Metchnikoff'sche theorie hierin gelegen is, dat zij niet alleen een cellulaire, maar ook een bij uitstek vitale 2) theorie genoemd mag worden. Wij kunnen ons toch bezwaarlijk een meer vitaal proces voorstellen dan den strijd tusschen makro- en mikroorganisme; en wanneer wij nu zien dat in dien strijd de witte bloedcellen zulk eene overwegende rol spelen, dan valt het den onbevangen onderzoeker moeilijk, aan de spelers dezer rol ook niet de voornaamste plaats toe te kennen in de rij der verdedigingsmiddelen van het geïnfecteerde organisme.

Sedert wij nu geleerd hebben, ook met levende leukocyten in vitro te experimenteeren, die, al mogen hunne reacties in verband met de niet volkomen natuurlijke verhoudingen in de reageerbuis in quantitatieven zin meer of minder zijn gewijzigd, toch bij veranderingen

1) l. c. pag. 567.

2) Om misverstand te voorkomen, onthoud ik mij opzettelijk van het adjectief: vitalistisch.

in het medium op verschillende prikkels in verschillenden zin blijken te antwoorden, — sedert dien is het gelukt wederom dieper door te dringen in het wezen van het phagocytoseproces. En zij die ons erop wijzen, dat reacties van leukocyten buiten hun natuurlijk milieu ons niet het recht geven de daaruit getrokken conclusies ook van toepassing te achten op het levende lichaam, zij mogen wel bedenken, dat men andererzijds bij de beoordeeling van de serumbaktericidie in vitro nog veel zwakker staat. Men mag toch niet uit het oog verliezen, dat men hier allermint met het levende bloedvocht werkt. De sterke baktericidie ten opzichte van miltvuurbacillen bij het serum van het voor miltvuurinfectie zoo gevoelige konijn is steeds een sprekend bewijs ervoor geweest, dat we hier -- met betrekking tot het serum — met een postmortaal, een afstervings-verschijnsel te maken hebben. Het staat nu ook immers wel voor goed vast, dat serumbaktericidie en immuniteit vaak genoeg geenszins parallel gaan.

Metchnikoff heeft meermalen gewezen op de waarde zijner theorie als uiting eener consequent doorgevoerde cellulair-pathologische opvatting, terwijl zijne tegenstanders zouden verzinken in het humoraal-pathologisch moeras. Dit argument nu, in zijne algemeenheid zeker niet onjuist, kan ons toch in elk bijzonder geval niet bevredigen. Wel verre van de beteekenis der vochten te ontkennen, zal het in de volgende hoofdstukken juist onze bedoeling zijn (en deze bedoeling spreekt reeds ten duidelijkste uit de keuze van mijn motto), om aan de humores de hun toekomende plaats in het phagocytoseproces zoo duidelijk mogelijk aan te wijzen. En laat ons ook niet vergeten, dat Virchow zelf getuigde „..... wie weit ich davon entfernt bin, die Richtigkeit der humoralen Deutungen im allgemeinen

zu bestreiten", en dat hij het principieele van zijn standpunt in de volgende verklaring uit het 7^e Hoofdstuk zijner Cellularpathologie aldus formuleerde: „Meine cellularpathologischen Anschauungen unterscheiden sich darin von den humoralpathologischen wesentlich, dass ich das Blut nicht als einen dauerhaften und in sich unabhängigen, aus sichselbst sich regenerirenden und sich fortpflanzenden Saft, sondern als ein in einer constanten Abhängigkeit von anderen Theilen befindliches flüssiges Gewebe betrachte."

In mijn sollicitatie-opstel ter verkrijging van een stipendium uit het Reisfonds der Medische Faculteit van het Amsterdamsch Studenten-Corps — nu ruim twee jaar geleden — ging ik uit van bovenstaande verklaring van Virchow, dateerende nog uit den vóór-bakteriologischen tijd, en ik bouwde daarop ongeveer de volgende overwegingen.

Onwillekeurig komt de gerechtvaardigde kritische vraag bij ons op, of wij niet physiologisch juister denken, wanneer we ook bij het immuniteitsvraagstuk met Virchow in 't oog houden, dat het bloed een weefsel is, dat zijne bijzondere positie juist dankt aan de omstandigheid dat het steeds zijne directe werking op alle weefsels en organen doet gevoelen — en omgekeerd —, dat het de permanente bemiddelaar is tusschen alle territoriën in den cellenstaat van het organisme, dat het de weg is waarlangs eene permanente wisselwerking tusschen alle organen onderling plaats heeft: een zeer groot aantal combinaties dus. Het zijn nu deze overwegingen, die als vanzelve tot een standpunt voeren, algemeener, ruimer dan dat der streng-Metchnikoff'sche school, en ons nader brengen tot de Ehrlich-Verworn'sche theorie: de „Leistungskern", het

„lebendige Eiweissmolekül” als causaal middelpunt van de stofwisseling der levende substantie in het algemeen, en de productie, of wil men, secretie van antistoffen als uiting dezer stofwisseling, als physiologische reactie van de gevoelige cel op het antigeen; eene opvatting dus, waarbij nòch eene bepaalde celsoort op den voorgrond wordt gedrongen, nòch eene andere groep wordt uitgesloten.

En zoo rijst dan de vraag, of Metchnikoff in zijn exclusivisme niet te ver gaat en toch ook weer niet ver genoeg: te ver eenerzijds waar hij alle immuniteitsverschijnselen niet alleen, maar zelfs alle pathologische verschijnselen tot phagocytair reacties wil terugbrengen („C'est cette lutte — c. à. d. entre les microbes et les phagocytes — qui est le fonds essentiel des phénomènes pathologiques”. 91), en anderzijds niet ver genoeg, waar hij de overige lichaamscellen van deze processen uitsluit. En al doet Metchnikoff nu ook een kleine concessie waar hij naast en tegenover de „phagocytes mobiles” plaatst de „phagocytes fixes”, en tot de laatste rekent de endotheliën, de cellen der miltpulpa en die van het beenmerg, toch kunnen wij de vraag niet onderdrukken of, bijaldien alléén de phagocyten en hunne producten tegenover de bakteriën staan, bij eene zóóver doorgevoerde arbeidsverdeeling de eenheid van het organisme niet te loor zou gaan?

Zoo dacht ik twee jaar geleden. Ik gevoelde toen veel voor een eclectisch standpunt, en meende, dat, zooals veelal bij twee sterk divergente meeningen het geval is, ook hier de waarheid wel ongeveer in het midden zou liggen, en dat er wel een brug zou zijn te slaan over de kloof, die Pfeiffer van Metchnikoff scheidt. Intusschen, voortgezette litteratuurstudie, ge-

steund door eigen experimenteel onderzoek, hebben mij geleidelijk tot de vaste overtuiging gebracht, dat, zoo het ons in de laatste jaren mocht gelukt zijn de waarheid ietwat dichter te benaderen, Metchnikoff ten slotte wèl vaart bij de resultaten van onzen arbeid. Uit de volgende bladzijden moge blijken, dat de opsoninen-onderzoekingen daartoe niet weinig hebben bijgedragen.

Toen Metchnikoff mij en andere vreemdelingen, die in zijn laboratorium kwamen arbeiden, in overweging gaf aan het opsoninen-vraagstuk onze krachten te beproeven, was het zijne bedoeling om door middel van de bestudeering der phagocytose in vitro den aard en de beteekenis der opsoninen nader te leeren kennen, en aldus zoo mogelijk dieper door te dringen in het wezen van het phagocytoseproces zelf. Ik meen dat ons zulks voor een deel gelukt is, en dat Metchnikoff's opvattingen in ons werk nieuwen steun hebben gevonden.

Uit de woorden dezer inleiding zal het reeds a priori duidelijk zijn, dat, terwijl het werk van Wright en zijn school in oorsprong en doel in hoofdzaak praktisch-klinisch is geweest, de leer der opsoninen door mij meer als immuniteits-probleem zal worden behandeld — al zal ik ook niet in gebreke blijven op praktische aanrakingspunten te wijzen en van klinische gegevens gebruik te maken, waar mij zulks wenschelijk voorkomt.

Overigens wil het verschijnen van een geschrift over het opsoninen-vraagstuk mij niet ongemotiveerd voorkomen, waar dit onderwerp in de oorspronkelijke medische litteratuur ten onzent ternauwernood is behandeld.

HOOFDSTUK I.

DE EXPERIMENTEELE GRONDSLAGEN VAN DE LEER DER OPSONINEN.

Immunitet, berustende op baktericidie der lichaamsvochten met de phagocytose als accessoir verschijnsel, — immunitet, berustende op phagocytose met serumwerking als bijkomstige factor: ziedaar de twee tegenstrijdige opvattingen. De opsoninen-theorie nu kunnen we beschouwen als eene poging tot verzoening: zij erkent de groote beteekenis van de phagocytose voor de verdediging van het organisme tegen mikrogen, doch tracht daarnevens den invloed vast te stellen van normaal- en immuunserum beide op het phagocytoseproces. Zij constateert dat de lichaamsvochten eene praepareerende werking op de mikrogen uitoefenen, zóó dat deze daardoor gemakkelijker en intensiever door leukocyten worden opgenomen. Deze werking wordt gezocht in specifieke stoffen, die door Wright *opsoninen*, door Neufeld *bakteriotropinen* worden genoemd. Ziehier Wright's gronddefinitie: „The blood fluids modify the bacteria in a manner which renders them a ready prey to the phagocytes. We may speak of this as an „opsonic” effect (opsono = I cater for; I prepare victuals for), and we may employ the term „opsonins” to designate the

elements in the blood fluids which produce this effect."

Het opsoninenonderzoek nu is eigenlijk èn in zijn oorsprong èn in zijn voornaamste resultaten tot nu toe een succes voor Metchnikoff geweest. Immers, Wright en Neufeld beide zijn uit eene humorale immuniteits-school voortgekomen. In Engeland toch was het allerm minst onopgemerkt gebleven, hoe Nuttall (1) bij Flügge in Breslau had aangetoond, dat miltvuurbacillen extracellulair worden vernietigd onder den invloed van gedefibrineerd bloed, eene vondst die Flügge e. a. aanleiding gaf tot levendige kritiek op de phagocyttaire theorie. Wright zelf publiceerte nog in 1900 en '01 eene door hem uitgedachte methode, om voor klinische doeleinden de baktericidie van het bloed ten opzichte van bac. typhi quantitatief te bepalen (2). Hij zag namelijk hierin de oorzaak van de immuniteit, welke hij, dank zij de door hem toegepaste vaccinbehandeling, bij den mensch kon opwekken.

Doch, de gegevens die men uit de serumbaktericidie in vitro putte, voldeden op den duur allerm inst voor de verklaring nòch van de aangeboren, nòch van de verkregen immuniteit. Lubarsch had reeds in 1889 (3) gewezen op het feit, dat, terwijl hond, kat en kip van nature resistent zijn tegen miltvuur, hun serum niet baktericide is, terwijl het bloed van 't konijn, welk dier zoo gevoelig is voor anthraxinfectie, sterke miltvuurdoodende eigenschappen bezit. Van dergelijke tegenstrijdigheden zijn gemakkelijk meerdere voorbeelden te geven: typhusbacillen en choleravibrionen worden reeds door normaal menschelijk serum vernietigd, terwijl zelfs immuun-serum niet in staat is staphylococcen, pestbacillen, bac. pyocyaneus en micrococcus melitensis in vitro te doden (4, 5). Bovendien hebben wij rekening te houden met de schijnbare baktericidie, welke de plaat-cultuur-

methode ons vertoont, wanneer alleen reeds tengevolge van de agglutinatieve eigenschappen van het te onderzoeken serum het aantal koloniën is verminderd. Doch vooral de sera, die in vivo preventief werken, doch in vitro alle baktericidie missen, waren oorzaak dat men zich meer en meer ging afvragen, of dan toch misschien in vivo naast de vochten de phagocyten de beslissende rol zouden spelen, en of de beteekenis dezer laatste — hetzij dan onder den invloed van het serum — ook niet in vitro kwalitatief en quantitatief zou zijn te bepalen.

De eerste poging hiertoe is gedaan door Leishman, toenmaals assistent van Wright aan de militair-geneeskundige school te Netley, die in 1902 publiceerde eene „Note on a method of quantitatively estimating the phagocytic power of the leucocytes of the blood.” (6) Het doel van de methode is, het aantal mikrogenen te tellen dat in een bepaalden tijd is opgenomen door de polynucleaire leukocyten van het te onderzoeken bloed. Het gemiddelde van de gevonden getallen vergelijkt men met dat van een contrôle-bloed, bij voorkeur van den onderzoeker, en dat opgevangen is onder gelijke voorwaarden als het eerste. Leishman mengt 1 vol. bloed (5 m.M^3), versch uit een vinger, met 1 vol. eener bacillensuspensie — beide in capillairen afgemeten — in een horlogeglas, brengt een druppel hiervan op de linkerhelft van een objectglas en legt hierop snel een dekglasje. Daarnaast verricht men dezelfde bewerking met het bloed van den waarnemer. Het objectglas met de beide proefjes wordt in een vochtige Petrischaal gedurende $\frac{1}{2}$ uur bij 37° bewaard. Dan maakt men de dekglasjes — zoo noodig met behulp van een druppel zoutsolutie — van het objectglas los, strijkt ze van dit laatste af, fixeert en

kleurt. 1) Men heeft dan twee praeparaten van elk der beide mengsels. Er worden in elk praeparaat b.v. 20 leukocyten geteld, en de gemiddelden van beide proeven met elkaar vergeleken door uitdrukking in een breuk. Tot 50 mikrogen kan men in één leukocyt tellen; vindt men cijfers daarboven dan moet men òf schatten (wat 't minst aanbevelenswaardig is), òf de bakterieele suspensie verdunnen, òf den tijd van het contact tusschen mikrogen en bloed bekorten. Het is duidelijk dat men, steeds het serum van eenzelfden gezonden persoon onder gelijke omstandigheden als contròle nemende, (of ook, zooals Wright soms doet, een mengsel van de sera van een aantal normale, volwassen, gezonde personen, zoogenaamd „pooled normal serum”), uit de verschillende uitkomsten van een aantal bepalingen zekere conclusies mag trekken omtrent de beteekenis van de variaties, welke men waarneemt in de wisselwerking van leukocyten, mikrogen en serum op elkaar. Leishman constateerde reeds bij een aantal voorloopige waarnemingen — in 't bijzonder in een paar gevallen van furunculose, welke door Wright met een staphylococcenvaccin werden behandeld — dat er parallellisme bestond tusschen de intensiteit der phagocytose en de klinische symptomen. Hij schreef de eerste toe aan het gehalte van het serum aan stimulinen, dus geheel in den geest van Metchnikoff.

Wright — inmiddels patholoog geworden aan St. Mary's Hospital te Londen — heeft toen, in hoofdzaak met medewerking van Douglas, de rol van het bloedvocht met betrekking tot het phagocytoseproces aan een nader onderzoek onderworpen, en de resultaten daarvan in

1) Bij voorkeur volgens Leishman's modificatie van de Romanovsky-kleuring, c.f. Brit. Med. Journ. '01.

eene reeks van mededeelingen aan de Royal Society neergelegd 1). In de eerste daarvan (7) wordt vermeld, hoe zij de boven beschreven methode van Leishman hebben gewijzigd.

- 1°. doen zij de phagocytose tot stand komen in capillaire buisjes,
- 2°. verhinderen zij de stolling van het bloed met behulp van een zwakke oplossing van citras natricus in physiologische zoutsolutie, waardoor het tevens mogelijk wordt door centrifugatie de leukocyten van de overige bloedbestanddeelen te scheiden, te decanteeren en te wasschen.

Overigens varieert hun techniek naar gelang van het doel dat met de verschillende experimenten wordt beoogd.

a. *Voor de eenvoudige vergelijking van twee of meer bloedsoorten.*

Men bezigt een capillair uitgetrokken buisje voorzien van een elastieken slangetje of gummikapje op het eene einde en een merkstreep op het capillaire gedeelte. Men zuigt achtereenvolgens hierin op: 1 vol. versch bloed (tot de streep), dan een luchtbelletje, 1 vol. citraat-oplossing, wederom een luchtbelletje, en ten slotte 1 vol. eener bakteriën-suspensie 2). Deze drie componenten worden dan op een glaasje gebracht, door eenige malen opzuigen en uitblazen goed gemengd, en ten slotte in het buisje opgenomen, waarna de punt hiervan wordt dichtgesmolten. 't Buisje wordt gedurende 15 min. op eene temperatuur van 37° gehouden; daarna wordt de punt afgebroken; men mengt nogmaals en maakt uitstrijkpraeparaten die verder volgens Leishman—Romanovsky worden behandeld.

1) Voor de complete litteratuur, zie Sauerbeck, Lubarsch-Ostertag's Ergebnisse. Jahrg. XI, '07.

2) Voor de bereiding hiervan, zie: pag. 57 en 59.

- b. *Voor de bestudeering van de rol van leukocyten en serum elk afzonderlijk, onder normale omstandigheden en bij experimenteele modificaties.*

In een speciaal omgebogen buisje wordt een bepaalde hoeveelheid citraat-oplossing gebracht, én daaraan een gelijke quantiteit bloed toegevoegd.

Men schudt en centrifugeert; het bovendrijvende vocht is dan zoogenaamd *citraatplasma*. Dit wordt afgepipetteerd, en in de plaats ervan gewone zoutsolutie toegevoegd. Men schudt, centrifugeert enz., en wast het bloed aldus driemaal. Na centrifugatie bevatten de bovenste lagen der uitgeslingerde bloedlichaampjes in hoofdzaak de leukocyten. Men mengt nu in een pipetje op dezelfde wijze als bij *a*, gewoonlijk: 3 vol. van de bovenste leukocytenrijke lagen + 3 vol. serum resp. plasma + 1 vol. bakteriën-suspensie. (In een afzonderlijk buisje heeft men inmiddels een weinig bloed laten stollen, ter verkrijging van serum).

- c. *Om zoo noodig serum met plasma (het zooeven genoemde citraat-plasma) te vergelijken.*

Men voegt citraatoplossing toe aan een gelijke hoeveelheid gestold bloed.

Men mengt, centrifugeert, en verkrijgt aldus *citraatserum*.

Met behulp van deze techniek verrichtten Wright en Douglas een reeks experimenten — voorloopig alleen met staphylococcen en normaal menschelijk serum en leukocyten — waarbij zij tot de volgende conclusies kwamen:

- 1°. Citraatplasma en citraatserum hebben gelijken invloed op de intensiteit der phagocytose.
- 2°. Door verwarming van het serum gedurende 10—15 min. op 60—65° kan men het serum bijna geheel van zijn phagocytose-bevorderenden invloed be-

rooven. (In één geval was het phagocytair gemiddelde 1) met verwarmd serum o.o., in drie andere proeven was er echter nog steeds een rest. Wij komen op de beteekenis hiervan later uitvoerig terug).

Men zou nu kunnen meenen, dat er in het serum bij de verwarming stoffen optreden, die de phagocytose belemmeren. Dit blijkt niet zoo te zijn, want:

- a. in zoutsolutie is de phagocytose niet sterker dan in verwarmd serum.
- b. verdunning van versch serum met zoutsolutie of met verwarmd serum geeft ongeveer gelijke resultaten.
3. Het serum werkt op de mikrogen, en niet op de leukocyten. Immers, laat men het serum eerst op de staphylococcen inwerken (15 min. bij 37°) en verwarmt daarna het mengsel (10 min. op 60°), dan is de phagocytose slechts weinig afgenomen. Toch was de phagocytose steeds duidelijk krachtiger wanneer de met versch serum gedigereerde mikrogen verwarmd werden opgenomen. Langere digestie deed de phagocytose nog wat meer toenemen, langere verwarming daarna nog iets meer afnemen. Indien we voorts de bakteriën vooraf met verwarmd serum digereeren, en deze voorbehandelde bakteriën met leukocyten samenbrengen, krijgen we steeds hogere waarden, dan wanneer we eenvoudig bakteriën, leukocyten en verwarmd serum bij elkaar voegen.
4. De verschillen in den graad van phagocytose met versch en verwarmd serum zijn niet kleiner bij staphylococcen, vooraf verwarmd op 115° C., dan bij versche coccen. Het is dus voor het resultaat

1) Onder phagocytair gemiddelde of phagocytair index wordt verstaan het gemiddeld aantal opgenomen mikrogen per leukocyt.

van de reactie onverschillig of de mikroben levend zijn of dood.

5. De opsonische kracht van het serum verdwijnt geleidelijk bij bewaren, ook in 't duister.
6. Hetzelfde geschiedt bij verwarming boven 50°.

Aan het slot van deze verhandeling vinden we de eerste klinische toepassing. Reeds eerder had Wright (8), in navolging van Leishman en met diens oorspronkelijke methode, een verhoogd phagocytair vermogen ten opzichte van staphylococcen kunnen aantoonen bij patienten, met een staphylococcen-vaccin behandelt. Hij herhaalt nu de bepaling met behulp van zijn nieuwe methode: phagocytose der coccen in vitro door gewaschen leukocyten onder invloed van serum van den patient, en daarnaast van normaal serum. De verhouding van de beide phagocytair indices, betrokken op den index voor normaal serum als eenheid geeft den *opsonischen index*.

Wright concludeert nu, dat het verhoogde phagocytair vermogen berust op verhoogde opsonische kracht van het serum, d. w. z. op toename van het gehalte aan opsoninen. Aangezien daarmede niet samenging eenige toename van de baktericide kracht van het serum, plaatst hij bakteriolytische, baktericide en opsonische effecten naast elkaar als afzonderlijke uitingen eener digestieve serumwerking op bakteriën. Omtrent de quaestie der stimulinen laten de schrijvers zich hier nog niet beslist uit.

In hun tweede publicatie (9) demonstreeren Wright en Douglas eerst nog, hoe bij een lijder aan zeer chronische sycois, die na drie injecties met een staphylococcenvaccin was verbeterd „in an astonishing manner,” niet de immuunleukocyten doch het serum oorzaak was van de verhooging van den phagocytair index.

De hoofdinhoud echter van deze mededeeling wordt gevormd door de beschrijving van een reeks experimenten met verschillende mikrogen, waarvan de phagocytose door normale menschleukocyten onder den invloed van versch en van geïnactiveerd normaal serum onderling wordt vergeleken. Daarnaast bestudeeren de schrijvers tevens de morphologische veranderingen der onderzochte mikroörganismen zoowel intra- als extra-cellulair, welke veranderingen door Wright alléén aan de serumwerking worden toegeschreven. De gegevens, uit de opsonische en uit de bakteriolytische werking van het serum verkregen, worden dan onderling vergeleken, en op grond daarvan worden de onderzochte bakteriën in vier groepen ingedeeld:

- I. Die welke zeer gevoelig zijn zoowel voor de bakteriolytische als voor de opsonische werking van normaal menschserum: bac. typhi, vibr. cholerae.
- II. Die, welke tamelijk gevoelig zijn voor de bakteriolytische, doch zeer gevoelig voor de opsonische serumwerking: bac. coli, bac dysenteriae.
- III. Die, welke absoluut ongevoelig zijn voor de bakteriolytische, doch zeer gevoelig voor de opsonische serumwerking: staphylococcus, bac. pestis, micrococcus melitensis, diplococcus pneumoniae.
- IV. Die welke ongevoelig zijn zoowel voor de bakteriolytische als voor de opsonische serumwerking: bac. diphtheriae en bac. xeroseos.

Wij willen hierbij reeds nu de opmerking maken, dat blijkbaar nooit voorkomt: bakteriolytische zonder opsonische serumwerking. Wij komen hierop later terug.

In hun derde en vierde mededeeling aan de Engelsche Koninklijke Akademie van Wetenschappen (10, 11) hebben Wright en Douglas het vraagstuk verder bestudeerd voor staphylococcen en tuberkelbacillen. Zij

vonden bij verschillende aandoeningen, door staphylococcen veroorzaakt (furunculose, sycosis, acne), en ook bij de meest uiteenloopende tuberculeuse infecties den opsonischen index van het serum der patienten voor het betreffende mikroorganisme steeds verlaagd. Zij zijn geneigd, dit verschijnsel liever als de *oorzaak*, dan als 't *gevolg* van de infectie te beschouwen, en wel om deze redenen:

- 1°. Zeer lage indices worden soms verkregen in gevallen, waar algemeene constitutioneele verschijnselen ontbreken of onbeduidend zijn.
- 2°. Men vindt ook vaak een lagen index in gevallen waar het ziekteproces zóó streng lokaal is, dat men daaraan bezwaarlijk eenigen invloed kan toekennen op het opsoninengehalte van het geheele organisme.

Zij meenen dus, dat een reeds bestaand zwak phagocytair vermogen, d. w. z. een praeëxistent gebrek aan passende opsoninen, bijv. aan de op de huid steeds aanwezige staphylococcen bij de geringste laesie de gelegenheid voor infectie verschaft. Intusschen blijkt uit waarnemingen van Wright en Douglas zelf dat bij locale aandoeningen het opsonisch vermogen van het vocht uit den infectiehaard steeds zwakker is dan dat van het bijbehorende serum. Zoo constateerden zij, dat bij staphylococcen-abscessen het abscessecreet een veel lager phagocytair gemiddelde gaf dan het bloedserum, en zij concludeerden daaruit dat de in het organisme binnengedrongen bakteriën zich vermeerderen op plaatsen van verlaagden bakteriotropen druk („regions of lowered bacteriotropic pressure”). Wat onder dezen term verstaan wordt, is na 't voorafgaande zonder meer duidelijk.

Evenzoo bleek bij tuberculeuse abscessen en exsudaten dat de bakteriotrope druk in den infectiehaard

steeds verlaagd was. In dit verband wil ik kortelings vooruitloopen op eene latere publicatie van Wright en Reid (12), waarin wordt meegedeeld, hoe op grond van bovenstaande feiten in verschillende gevallen met goed succes de diagnose werd gesteld. Bij locale aandoeningen werden namelijk voor enkele verdachte mikrogen de phagocytair indices bepaald, die het bloedserum en het vocht uit den infectiehaard gaven. Bleek nu bij vergelijking van deze beide, dat bij één dier mikrogen de index voor 't laatste belangrijk lager was dan die voor het eerstgenoemde, dan werd het betreffende mikroorganisme als het infectieuze agens beschouwd, hetgeen veelal door de bakteriologische diagnose kon worden bevestigd. Zelfs menginfecties bleken op deze wijze juist te kunnen worden gediagnostiseerd.

Het dierexperiment was geheel in overeenstemming met deze feiten: bij een konijn in een vroegstadium van miltvuurinfectie werd bloed uit het oor met lymfe van de plaats van enting vergeleken, met het volgende resultaat:

anthraco-opsonische index.

voor het bloedserum 1.7.

voor de lymfe , . . 0.62.

Waarom nu echter bij een natuurlijk lokaal infectieproces de a posteriori gevonden plaatselijk verlaagde bakteriotrope druk verantwoordelijk moet worden gesteld voor de ontwikkeling der bakteriën in loco, is niet duidelijk. Het is natuurlijk niet na te gaan, of daar ter plaatse ook a priori de opsonische kracht van het weefselvocht abnormaal laag is geweest. In elk geval blijkt wel, ook uit het zooeven aangehaalde dierexperiment, dat de infectie zelf een verbruik of fixatie van het opsonin met zich brengt, waardoor dus de verlaagde bakteriotrope druk *gevolg* van de infectie zou zijn.

Voor het oogenblik wil het mij voorkomen, dat de eene mogelijkheid de andere niet uitsluit 1).

De derde en vierde publicatie van Wright en Douglas bevatten verder in hoofzaak mededeelingen betreffende de resultaten van immuniseeringsproeven met vaccins bij staphylomycosen en bij tuberculeuse aandoeningen. De voornaamste conclusies, waartoe deze en vroegere desbetreffende proeven van Wright leidden, zijn deze:

- 1°. Bij immuniseering treden er veranderingen op in den opsonischen index.
- 2°. Deze veranderingen vertoonen, afgezien van kleinere schommelingen in de curve, twee constanten, nl. eene zoogenaamde „negatieve phase” dadelijk na elke injectie en van korten duur, gedurende welke de opsonische index is verlaagd, gevolgd door eene „positieve phase”, die langen tijd aanhoudt en eene periode van versterkt opsonisch vermogen van het serum vertegenwoordigt. De negatieve phase is een stadium van grootere gevoeligheid van het individu, de positieve phase is er een van verhoogd weerstandsvermogen.

Terwijl nu de schommelingen in de agglutinatiecure weinig of geen houvast geven ter beoordeeling van den immuniteitstoestand, en de variaties in bakteriolytisch vermogen van het serum slechts voor bepaalde microben in vitro kan worden bepaald, blijkt de opsonische curve voor alle tot nu toe bestudeerde mikro-organismen steeds hetzelfde type te vertoonen, terwijl ook de stijging van den opsonischen index en de

1) Onverklaard blijft, waarom het opsonisch vermogen reeds vóór de infectie verlaagd zou zijn. Misschien ten gevolge van stofwisselingsstoornissen? Ik denk hierbij aan de acne-erupties bij vele vrouwen kort vóór en tijdens de menstruatie.

voortgang in de klinische symptomen steeds hand in hand gaan. Zoo verschaft Wright ons in zijn methode van onderzoek niet alleen een middel voor het stellen der diagnose bij infectieuse processen van allerlei aard, maar ook eene handleiding voor de juiste toepassing zijner immunisatiemethode met behulp van bacterieele vaccins. (13)

Voor 't oogenblik willen wij op praktisch-klinische beteekenis der opsoninen, zooals die door Wright en anderen in eene reeds vrij uitgebreide litteratuur is uiteengezet, niet verder ingaan. Wij zullen daarvan alleen nota nemen, voor zooverre wij daaruit gegevens kunnen putten voor de beantwoording van de vraag, welke ons in de volgende bladzijden in hoofdzaak zal bezighouden: zijn de opsoninen stoffen sui generis, specifiek en autonoom, of wel, zijn ze identiek met reeds bekende antistoffen, waarvan zij slechts eene nieuw-ontdekte of nauwkeuriger bestudeerde eigenschap vertegenwoordigen?

Aan het slot van dit hoofdstuk zijn enkele opmerkingen op haar plaats over de beteekenis, welke door Wright aan het woord *vaccin* wordt gehecht. In den zin van Pasteur hebben we hieronder te verstaan: cultures van *levende* doch verzwakte mikroörganismen, die voor immunisatie gebruikt worden. (b.v. Pasteur: miltvuur, Haffkine: cholera). Wright vond nu, dat bij 60° gesteriliseerde cultures, b.v. van typhus- en tuberkelbacillen en van staphylococcen, voor immuniseeringsdoeleinden minstens even bruikbaar zijn wat de betrouwbaarheid der resultaten betreft, en dat ze bovendien meer aanbevelenswaardig zijn voor toepassing bij den mensch, dank zij hare ongevaarlijkheid.

Er zijn nu schrijvers, die de opmerking gemaakt

hebben, dat Wright verwarring sticht in de terminologie, wanneer hij zijne *gedoode* cultures met den naam „vaccins” bestempelt. Intusschen blijkt uit zijne geschriften ten duidelijkste, dat Wright geenszins voor zijne entstoffen dezen naam opeischt. Het zal ons gemakkelijk vallen, dit uit een tweetal citaten aan te toonen:

„A tubercle vaccine,” zegt hij ergens (11), „may be defined as any derivative of the protoplasm of the tubercle bacillus, which is capable of inducing an elaboration of tuberculotropic substances in the organism,” en hiertoe rekent hij: 1°. de door hem gebruikte gedoode cultures, 2°. Koch’s nieuw tuberculine TR, en 3°. Koch’s oud tuberculine.

Op pag. 2 zijner monographie over anti-typhus-inoculaties (13) heeft hij ’t over: „Die Beziehungen zwischen dem injizierten Fremdkörper, den wir ohne Rücksicht auf seinen Ursprung als Vaccin bezeichnen wollen, und dem im Blute der injizierten Tiere in die Erscheinung tretenden chemischen Produkt.”

Het is duidelijk, dat Wright — en dat schijnt mij juist eene verdienste — het begrip *vaccin* zoo ruim mogelijk wil genomen zien, en dat hij, geheel in den zin van Ehrlich eronder verstaat: een antigeen dat in het organisme tot de vorming van antigenotrope stoffen aanleiding geeft.

HOOFDSTUK II.

DE LEER DER BAKTERIOTROPINEN.

Wij moeten nu onze aandacht gaan wijden aan enkele publicaties van Neufeld en zijne medewerkers uit het Gesundheitsamt te Berlijn, welke in 1904 begonnen te verschijnen, en wel na de vierde mededeeling van Wright en Douglas, doch die onafhankelijk van deze schijnen te zijn ontstaan. Ze handelen dan ook over phagocytose in vitro onder den invloed van immuunsera, terwijl Wright juist uitging van normaal serum.

Neufeld en Rimpau (14) dan wijzen erop dat het onjuist is om, wanneer in het dierexperiment een serum preventief is doch niet antitoxisch blijkt, te zeggen dat het dus baktericide is, zonder dit laatste in vitro of in vivo te hebben aangetoond. Immers, ook bactericidie blijkt bij onderzoek meermalen afwezig, en wij moeten dan ter verklaring van de preventieve werking van het serum een derde vorm van immuniteit te hulp roepen, waarbij de leukocyten hunne noodzakelijke medewerking verleen.

Het uitgangspunt van Neufeld's proeven vormden de onderzoekingen van Denys en zijne leerlingen over de werking van streptococcen- en pneumococcen-immuunsera bij het konijn. Vooral die van Denys en

Leclef (15) zijn zóó fraai uitgevoerd en voor ons onderwerp van zóó fundamenteele beteekenis, dat wij die hier niet slechts oppervlakkig mogen refereeren. Hunne grondstelling dan is deze: „Dans une étude sur l'immunité, il importe de tenir compte de deux facteurs: les humeurs et les leucocytes. Dans le corps de l'animal, ces deux facteurs ne sont jamais séparés”, en daar nu deze twee factoren in vivo niet te scheiden zijn moeten wij de zuivere experimenteele voorwaarden voor een goed deel in de reageerbuis zoeken. Zij werkten met een antistreptococcenserum, afkomstig van een gevaccineerd konijn. Terwijl nu normaal konijnserum een uitstekenden voedingsbodem voor streptococcus pyogenes uitmaakte, had het immuun serum slechts eene voorbijgaande belemmerende werking op den groei en werd daarna een even voortreffelijk milieu als 't normale serum.

Terwijl nu in het mengsel: streptococcen — normaal serum — normale leukocyten de phagocytose minimaal was, werd deze plotseling maximaal wanneer voor 't normaalserum het immuunserum werd gesubstitueerd, terwijl ook de opgenomen coccen door intracellulaire digestie werden vernietigd. Denys en Leclef stellen daarom de volgende eigenschappen van het bewuste immuunserum vast:

- 1°. „Il retarde le développement du streptocoque par une action directe sur le microbe.”
- 2°. „Il augmente l'activité des leucocytes et concourt ainsi à enrayer la pullulation d'une façon indirecte.”

Eene werking dus in beide richtingen. Uit het feit nu, dat leukocyten van normale en van immune dieren zich in hetzelfde milieu volkomen gelijk gedragen, besloten zij dat alles aankomt op het milieu.

Wat nu de verschijnselen in vivo aangaat: bij de

enting van streptococcen in het oor van een normaal en van een immuun konijn zien we bij beide dieren locale ophooping van leukocyten optreden, bij het normale konijn echter zonder daarop volgende phagocytose.

Wil men nu het toevloeien van de leukocyten en het opnemen der mikroben verklaren uit de positieve chemotaxis, dan stuit men op moeilijkheden. Men dient namelijk, volgens Denys en Leclef, twee verschijnselen wél van elkander te onderscheiden. Het eerste is de aankomst der leukocyten, maar bij het normale konijn blijft 't hierbij. Hoe dit nu te verklaren? Door positieve chemotaxis? Maar de phagocytose blijft uit; mikroben en leukocyten stooten elkander af. Negatieve chemotaxis dan? Maar, waardoor dan die toevoer van leukocyten? Men ziet, zóó komen we niet verder. We moeten dan ook voor de verdere verklaring het eigenlijke phagocytoseproces als afzonderlijk tweede verschijnsel opvatten, voor 't tot stand komen waarvan de specifieke serumwerking noodig is, en deze is 't juist welke bij het normale konijn ontbreekt.

Wij willen hieraan nog toevoegen, dat positieve en negatieve chemotaxis slechts namen zijn voor de sensibiliteitsuitingen der leukocyten voor chemische prikkels, die ons echter in zake immuniteit weinig of niets verklaren. En bovendien: zelfs met het aannemen van de beide genoemde afzonderlijke verschijnselen komen we er nog niet. Er moet nog als derde en noodzakelijk verschijnsel de intracellulaire digestie volgen. Blijft deze uit, zooals in bepaalde gevallen geschiedt, -- kunnen de opgenomen mikroben weerstand bieden aan de leukocytaire fermenten (doordat deze te zwak of wel afwezig zijn), vermeederen de bakteriën zich intracellulair en richten ze de leukocyten te gronde,

dan is er met de phagocytose als zoodanig voor de immuniteit van het organisme niets bereikt.

Wat nu de verklaring van de werking van het immuunserum betreft: er is, zoo meenen Denys en Leclef, een ontwijfelbare invloed van het serum op de reactie der leukocyten in het phagocytair mengsel waar te nemen. „Mais en quoi consiste cette action du sérum sur le globule?” Metchnikoff's stimulintheorie willen ze niet aanvaarden, want in de onderzoekingen die aan deze theorie ten grondslag liggen (16) is naar hunne meening niet aangetoond, dat het betreffende immuunserum alléén op de leukocyten en ook niet tevens op de microben werkte. En bovendien: zij vinden de bewegelijkheid der leukocyten bij normale en bij immune dieren volkomen gelijk, en die van de eerste zijn op zich zelf niet meer torpide dan die van de laatste.

Na dit niet erkennen eener direct activeerende werking van het immuunserum op de leukocyten in den zin van Metchnikoff moeten Denys en Leclef wel in de andere richting hunne verklaring gaan zoeken. Zij schrijven dan ook: „A notre avis, on pourrait tout aussi bien admettre que la substance vaccinante ou antitoxique agit, non pas sur le leucocyte, mais sur un poison renfermé dans le corps du microbe ou dissous dans le milieu, et qui préserve le microorganisme contre les atteintes du leucocyte.” Hier wordt dus door deze schrijvers voorgevoeld, wat eerst later experimenteel zou worden bewezen, namelijk de directe praepareerende werking van het serum op de microben en het aldus vrij maken van den weg voor de leukocyten, d. w. z.: wèl eene werking op de leukocyten, doch slechts eene *indirecte*, via de microben.

Ook in een volgend onderzoek met Marchand (17) is Denys over dit ietwat weifelende, neutrale standpunt niet heengekomen. Al verzet hij zich tegen den *naam* der stimulinen, aan de *idee* der theorie kan hij zich niet geheel ontworstelen. „Chez le lapin vacciné, le leucocyte tient du sérum son pouvoir d'englober et de détruire le streptocoque pyogène.” Toch moet men in zijne opvattingen eene toenadering zien tot de „humorale” theorie.

Mennes (18) kon later de door Denys voor streptococcen aangetoonde verschijnselen bij pneumococcen bevestigen.

Waar Denys nu in 1895 nog erkennen moest „que l'on n'est pas fixé sur la nature de l'influence que le sérum préservateur exerce sur le globule blanc,” daar is het de verdienste van Neufeld en Rimpau, dat zij door fixatieproeven in vitro ontwijfelbaar hebben aangetoond, dat het serum zijn directe werking op de mikroben en niet op de leukocyten doet gelden.

Metchnikoff heeft op meer dan ééne plaats protest aangeteekend tegen de resultaten van Denys, omdat volgens hem de voorwaarden voor leukocytaire reacties in vitro zóó geheel andere zijn dat daaruit geen gevolgtrekkingen gemaakt mogen worden ter verklaring van verschijnselen die zich in het lichaam voordoen. Later echter is Metchnikoff van zijn afkeurend oordeel over phagocytoseproeven in vitro teruggekomen. De oorzaak van zijne kritiek in deze lag echter dieper: het was de aanval van Denys en Leclef op de theorie der stimulinen. Toch kon deze aanval geen beslissende zijn, aangezien het krachtigste wapen, nl. de fixatieproef, hun nog ontbrak. Intusschen schijnt mij, ook na het verrichten van deze proef door Neufeld en

Rimpau, en zelfs met den val der stimulinen, de phagocytaire immuniteitstheorie geenszins in hare fundamenteen aangetast.

Hoe dit ook zij, Neufeld en Rimpau konden de resultaten van Denys en Leclef volkomen bevestigen, zoowel voor streptococcen als voor pneumococcen, en zij completeerden die nog met het bovenvermelde fixatie-experiment. Voorts bleek er volkomen analogie te bestaan tusschen de verschijnselen in vitro en in vivo: in beide ontbrak de extracellulaire bakteriolyse volkomen, terwijl ook de invloed van het immuunserum op de phagocytose bij beide gelijk was. Bovendien bleek de serumwerking specifiek te zijn: pneumococcen-immuunserum bevordert niet de phagocytose van streptococcen, en omgekeerd: Ook is 't geen beschadiging of dood, dien de mikroben onder den invloed van het serum ondergaan, want dezelfde coccen, vooraf gedood, werden eveneens alléén onder den invloed van het immuunserum gefagocyteerd. Uit het feit, dat „inactief” immuunserum even goed bevorderend op de phagocytose werkte als versch, besloten zij dat het complement in deze geen invloed had, maar dat de bakteriën een zekere thermostabiele stof fixeeren „den wir wohl mit den Pfeifferschen Immunkörpern in Analogie setzen dürfen.” ¹⁾ Van deze opvatting nu zijn zij in hun tweede en voornaamste publicatie (19) teruggekomen; op den inhoud daarvan moeten wij, ter wille van de daarin vervatte theoretische beschouwingen, wat dieper ingaan.

Neufeld en Rimpau dan achten hunne resultaten een

¹⁾ Terloops zij hier de opmerking gemaakt, dat wij bij Neufeld en Rimpau tevergeefs zoeken naar quantitative bepalingen, ter constateering van eventueele verschillen in de phagocytose-intensiteit resp. met versch en met geïnactiveerd immuunserum.

steun voor de Metchnikoffsche opvatting, in zooverre als bij de immuniteit tegen streptococcen en pneumococcen de phagocytose „die ausschlaggebende Rolle” blijkt te spelen. Maar bij de verklaring van het proces, daar loopen de meeningen uiteen. Zij wijzen eveneens terloops nog op het irrationeele van Metchnikoff's bestrijding der resultaten van Denys en Leclef, alleen op grond dat de proeven buiten het dierlijk lichaam zijn verricht. Immers, Metchnikoff zou gelijk hebben, indien de uitkomst in vitro negatief was of belangrijk zwakker dan in corpore, maar er blijkt juist een volkomen parallellisme te bestaan tusschen de verschijnselen in vitro en in vivo.

De stimulinentheorie moet naar hunne meening vallen, sedert bewezen is dat het immuunserum werkt op de mikrogenen, en geen direct stimulans of excitans is voor de leukocyten. En bovendien: immuunleukocyten blijken niet beter „opgevoed” of „getraind” te zijn, hebben geen grootere gevoeligheid in den een of anderen zin dan normale leukocyten. Beidē reageeren gelijkelijk op de aanwezigheid van immuunserum in het phagocytair mengsel, en ook de leukocyten van het immune dier moeten het, ten behoeve van hunne phagocytair actie, van het immuunserum hebben. Bovendien is de stimulinentheorie onvereinigbaar met de grondgedachte van de Ehrlichsche theorie welke leert dat de antistof allēen werkt op het antigeen of hoogstens ook op verwante stoffen met gelijksoortige receptoren, maar niet op lichaamcellen, zooals op leukocyten.

Neufeld en Rimpau willen zich nu in hunne conclusies niet beperken tot de streptococcen- en pneumococcen-immuunsera, doch willen de bij deze verkregen resultaten „als allgemeingültige auf die analogen Ver-

hältnisse bei anderen Mikro-organismen übertragen." Zij noemen de sera die de bedoelde werking ontvouwen *bakteriotroop*, en plaatsen deze naast en tegenover de bakteriolytische sera.

Wat nu de zelfstandigheid betreft van de specifieke antistoffen, waarop de bakteriotrope serumwerking berust: de schrijvers meenen dat ze niet identiek zijn met de agglutininen, want zij hadden o. a. een immuunserum van het konijn in handen, dat sterk bakteriotroop was voor streptococcen doch absoluut niet agglutineerend. Of er verband bestaat met de lysinen kon in casu niet worden nagegaan, daar volgens Neufeld en Rimpau bakteriolytinen in hunne streptococcen- en pneumococcen-immunsera ontbraken. 1) Daar echter Neufeld met Töpfer (20) een haemolytisch serum aantrof, dat wèl zeer lytisch en agglutineerend doch niet phagocytose-bevorderend werkte, — en aangezien haemolytische en bakteriolytische antisera van immuniteits-standpunt geheel vergelijkbaar zijn —, besluiten zij tot de niet-identiteit van bakteriotropinen en bakteriolytinen.

Wat nu de wijze van werking der bakteriotrope sera aangaat: Neufeld en Rimpau verdedigen de opvatting dat ze bezetten en buiten functie stellen die receptoren der bakteriën, welke de dragers der virulentie zijn. 2)

1) N. en R. bedoelen: er kon geen bakteriolyse worden aangetoond — wat allermint hetzelfde is! In elk geval zijn zij in gebreke gebleven, het amboceptorengehalte te bepalen met behulp van de methode van Bordet-Gengou. Wel erkennen zij de mogelijkheid dat bij coccen bij aanwezigheid ook van versche immunsera de lysis misschien uitblijft bij gebrek aan passend complement. Hieruit blijkt de wenschelijkheid, de quaestie nader te onderzoeken bij bakteriën waarbij extracellulaire lysis en phagocytose optreden onder den invloed van het immuunserum. Dit heeft Neufeld dan ook later gedaan (21): zie Hoofdstuk VI.

2) N. en R. volgen dus Pfeiffer in zijne verklaring van het virulentiebegrip.

Zij zoeken dus het aangrijpingspunt van de bakteriotropinen in de bakteriëlichamen zelf en niet in bepaalde door deze gesecerneerde stoffen, en wel omdat doode coccen, die zulke stoffen niet meer produceeren, eveneens door immuunserum voor de phagocytose worden gepraepareerd. En de virulentie-receptoren blijven ook bij doode mikrogen bestaan, — immers, met virulente zij 't ook gedooide mikrogen immuniseerende krijgen we de meest werkzame en aan immuunstoffen rijkste antisera.

Nu meenen Neufeld en Rimpau verder dat de septicaemie-verwekkende mikrogen, waartoe strepto- en pneumococcen in 't bijzonder behooren, vooral verderfelijk werken door hare virulentie, „d. h. durch ihre Fähigkeit, sich im Blute und in den Organen des Körpers scheinbar schrankenlos zu vermehren.” Hierbij mag wel worden opgemerkt, dat de *vermeerdering* als zoodanig nooit het verderfelijke is, maar wel de daarbij in grootere hoeveelheid geproduceerde toxische producten. Overigens treft het ons, hoe onnauwkeurig in dit opstel met de begrippen pathogeniteit en virulentie wordt gewerkt, hetgeen des te meer afkeuring verdient in eene verhandeling waarin men aan de Immunitéitsleer eene nieuwe bladzijde wil toevoegen.

De virulentie van mikrogen nu uit zich in de eerste en voornaamste plaats in de productie van toxische stoffen, welke op de leukocyten in een niet immuun milieu een negatief-chemotactischen invloed uitoefenen; in een immuun milieu echter wordt de negatieve chemotaxis in een positieve omgezet, doordat — zooals wij gezien hebben — thermostabiele bakteriotrope stoffen op de mikrogen worden gefixeerd. Wil men nu de virulentie in bepaalde receptoren localiseeren, dan is er niets tegen de voorstelling in te brengen dat, wanneer ten gevolge van de aanwezigheid van het immuunserum

de leukocyten niet meer op een afstand worden gehouden en vermeerdering der mikrogen, dank zij phagocytose en intracellulaire digestie, ten eenenmale is uitgesloten, — dat dan het immuunserum dus die receptoren onschadelijk gemaakt moet hebben, welke de dragers der virulentie zijn. Men staat dan tevens sterker, dan wanneer men, op 't voetspoor van Bail, meent, dat de vrije afgestooten virulentie-receptoren, de aggressinen, door het immuunserum worden geneutraliseerd. Immers, daarmee is aan de virulentie der mikrogen zelve, aan hun vermogen om nieuwe negatief chemotactisch werkende stoffen te secerneeren, d. i. aan hare aggressiviteit, nog in 't minst geen paal of perk gesteld, — waarop Bail's critici dan ook niet hebben nagelaten de aandacht te vestigen.

Wanneer we ons nu bedenken, dat en met geïnactiveerd immuunserum gesensibiliseerde mikrogen, en ook met inactief haemolytisch serum voorbehandelde erythrocyten aan eene uiterst snelle en intensieve phagocytose ten prooi zijn, dan komt de gerechtvaardigde vraag bij ons op, of Neufeld en Rimpau niet beter hadden gedaan bij hunne oorspronkelijke opvatting te blijven, en hunne nieuw ontdekte thermostabiele bakteriotrope stoffen te identificeren met de Pfeiffersche immuunlichamen, d. i. met de Ehrlichsche amboceptoren. Immers, het uitblijven van lysis mag ons niet doen besluiten tot de afwezigheid van sensibilisatoren; dit leeren ons Bordet en Gengou. Herinneren we ons voorts dat Wright voor een aantal mikrogen ten opzichte van menschelijk serum nooit lysis vond zonder gelijktijdige opsonische werking. Met het oog op dit alles schijnt mij de onderstelling niet te bout, dat de enkele immuunsera (zooals Neufeld en Töpfer er een

vonden) die wel lytisch doch niet bakteriotroop schijnen te zijn, en waarop de zelfstandigheid der bakteriotropinen wordt gegrond, dat dezulke wel tot die nog niet nader verklaarde uitzonderingsgevallen zullen behooren, zooals we er in de praktijk der immuniteitstechniek meer ontmoeten.

Wij zullen hierop nog nader in extenso moeten terugkomen. Het was slechts de bedoeling der laatste zinsneden, er nu reeds op te wijzen, dat de bakteriotropinen van Neufeld — op zijn zachtst genomen — in hun eigenschappen veel overeenkomst vertoonen met de amboceptoren der immuunsera. Het schijnt mij dan ook praematuur, dat Neufeld op grond zijner proeven en theoretische beschouwingen gemeend heeft de aanwezigheid van nieuwe stoffen in immuunsera te mogen veronderstellen. Het is toch principieel te verwerpen, om aan elke (schijnbaar) nieuw ontdekte serumeigenschap een nieuwen naam te geven, daarbij zichzelf en anderen diets makend, dat men ook werkelijk met eene nieuw ontdekte stof te doen heeft, terwijl later bij nader onderzoek vaak blijkt dat deze indentiek is met eene reeds bekende antistof, waarvan men slechts een niet of nog niet nauwkeurig bestudeerde eigenschap aan het licht heeft gebracht.

Bij het verschijnen der eerste publicatie van Neufeld en Rimpau in de Deutsche Medizinische Wochenschrift ontdekte Wright reeds dadelijk de bestaande analogie der daarin beschreven verschijnselen met zijne eigene waarnemingen. Aangezien nu zijn naam in bedoeld artikel niet voorkwam, gevoelde hij zich in zijne prioriteitsrechten te kort gedaan, en gaf aan dat gevoel uiting, eenige weken later in hetzelfde weekblad (22). Hij wees er op dat hij reeds vroeger had aan-

getoond dat meerdere sera (ook menschelijk serum) voor verschillende mikroben absoluut niet baktericide zijn, dat in deze gevallen de phagocytose van het grootste belang is, dat de intensiteit daarvan kan worden verhoogd door vaccinbehandeling, en dat deze kan worden gemeten „mittels einer quantitativen Methode zur Messung der Phagocytose, die von meinem früheren Assistenten Leishman stammt.” Voorts herinnert Wright er aan dat hij heeft aangetoond, dat de versterking van de phagocytose niet haar oorzaak vindt in training van de leukocyten, maar in verandering van het serum n.l. in de productie van een stof die niet stimuleerend op de leukocyten doch praepareerend op de bakteriën werkt. Vandaar zijn terminologie: opsonische substantie. („Lateinisch opsono = ich bereite die Nahrungsmittel zur Mahlzeit vor.”)

In zijn antwoord (in hetzelfde nummer der Deutsche Med. Wochenschr.), dat in een onaangenaam autoritair toon is gesteld, deelt Neufeld mede, dat Wright's publicaties hem „völlig unbekannt” waren — hoewel deze sedert eenige jaren in „Proceedings”, Lancet en British Medical Journal in extenso waren verschenen. 1) Overigens blijkt hij ook nu daarvan geen of niet voldoende kennis te hebben genomen, of wel de beteekenis ervan niet te kunnen of willen doorzien, anders toch had hij er zich niet zoo oppervlakkig afgemaakt, en zou hem ten minste de analogie zijn opgevallen tusschen de versterkte phagocytose onder den invloed van het serum van actief geïmmuniseerde (gevaccineerde) menschen en die bij aanwezigheid van het serum van immune dieren. Het zwakke punt bij Wright is echter

1) Ook in zijn onderzoek met Töpfer geeft Neufeld blijk van onvoldoende kennisname der litteratuur, in casu ten opzichte van Savtchenko. (Zie pag. 117).

— en Neufeld laat natuurlijk niet na daarop met nadruk te wijzen —, dat hij ook in de opsoninen van immuunsera *thermolabiele* stoffen wil zien (c.f. pag. 53), terwijl Neufeld juist de *thermostabiliteit* zijner bakteriotropinen heeft aangetoond.

Hiermede was de strijd tusschen Wright en Neufeld over nomenclatuur en prioriteit nog niet uitgestreden. In zijn tweede publicatie in samenwerking met Reid laat Wright (23) de quacstie van de werkingswijze en van de identiteit rusten, en wijst in zake de nomenclatuur op 't volgende: De naam bakteriotropinen duidt niets anders aan dan dat de aldus genoemde stoffen het vermogen bezitten om eene chemische binding met bakteriën aan te gaan, en behoort dan ook gebruikt te worden, in den zin van Ehrlich, als verzamelnaam voor alle specifiek op bakteriën werkende immuunlichamen. Het is daarom onjuist, dezen naam te bezigen voor de stoffen die de bakteriën voor de phagocytose praepareeren, en die slechts eene enkele onderafdeeling van de geheele groep vertegenwoordigen. Maar bovendien, afgezien van de waarde der terminologie, Wright heeft den naam „bacteriotropic substances” 't eerst gebruikt (24), en hij eischt daarom tegenover Neufeld voor zich het recht op, om aan dezen naam zijn technische beteekenis toe te kennen. 1) Overigens komt naar Wright's meening ook niet aan Neufeld de eer toe, de onhoudbaarheid der stimulinentheorie te hebben aangetoond. Denys en Leclef, later Mennes e.a. hadden, op grond hunner experimenten, reeds aan de juistheid dezer theorie getwijfeld. „Finally, the incorrectness of

1) Wright verklaart hier het woord gevormd te hebben naar analogie van het woord „neurotropisch” e.d., door Ehrlich ingevoerd. „The affix „tropic” as thus used signifies the property of „turning towards” and of entering into chemical composition with.”

the view that immunisation depends on a modification of the leucocytes was for the first time unambiguously established by one of us working in conjunction with Douglas."

In zijn laatste publicatie met Hüne over het onderhavige onderwerp behandelt Neufeld het werk van Wright c.s. veel uitvoeriger en waardeerder dan vroeger, doch blijft zijne bakteriotropestoffen en hun naam handhaven. Op grond waarvan zullen wij later zien.

HOOFDSTUK III.

ENGELSCH E ONDERZOEKINGEN OVER EIGENSCHAPPEN EN CONSTITUTIE DER OPSONINEN.

Verschillende, in hoofdzaak overzeesche, onderzoekers hebben zich verder met de wetenschappelijke zijde van het opsoninenvraagstuk beziggehouden, en een antwoord gezocht op de vraag naar het eigenlijke wezen van de opsonische serumwerking. Wij willen enkele daarbij aan het licht gekomen verschijnselen nader beschouwen, en nagaan in hoeverre deze ons inzicht in het wezen der zaak kunnen verduidelijken.

Bulloch en Atkin (25), die met staphylococcen en normaal menschelijk serum werkten konden de resultaten van Wright en Douglas bevestigen in zake de aanwezigheid in normaal serum van een thermolabiele stof, die zich op de mikroben fixeert. Voorts constateerden ook zij, dat de leukocyten eigenlijk „indifferent” zijn, en dat de serumopsoninen in de reactie den variabelen factor vormen waarop het in hoofdzaak aankomt.

Een deel van hun onderzoek verdient eene nadere beschouwing. Versch serum, als zoodanig boven 55° verwarmd, bleek zijn opsonisch vermogen bijna geheel te hebben verloren, of m.a.w. de vrije serumopsoninen

worden bij de gewone inactieveeringstemperatuur vernietigd. Anders was 't echter met de op bakteriën gefixeerde opsoninen. Dit nu hadden Wright en Douglas reeds vermeld (7); laat men n.l. het serum eerst 15 minuten op de bakteriën inwerken en verwarmt dan het mengsel, zoo blijkt de phagocytose veel minder verzwakt te zijn. Zij verkregen b.v. bij verhitte van het serum vóór de inwerking op de bakteriën phagocytair gemiddelden van:

3.4, 3.25, 4.2, 4.0 en 3.2,

terwijl de cijfers bij verhitte van serum en bakteriën na de inwerking van het serum op de bakteriën waren:

27.5, 28.9, 28.2, 31.0 en 33.36.

Uit deze gegevens was het juist, dat zij besloten dat het serum op de bakteriën en niet op de leukocyten werkt.

In (II) hebben Wright en Douglas dit verschijnsel nader voor tuberkelbacillen bestudeerd, en de proeven aldus ingericht:

Mengsel A bevat: versch serum
tuberkelbacillen 1)
gewassen bloedlich. }

Mengsel B bevat: versch serum
tuberkelbacillen } contact 15 min. bij 37°,
dan verwarmd 10 min.
bij 60°, en vervolgens gewassen leukocytenerbij.

Mengsel C bevat: versch serum
tuberkelbacillen } dadelijk verwarmd 10 min.
bij 60°, en dan gewassen bloedlich. toegevoegd.

(Serum, leukocyten en tuberkelbacillen resp. in de volumeverhoudingen: 2—2—1.)

1) Om agglutinatie der bacillensuspensie, zoowel spontaan als onder invloed van het serum, te vermijden, wordt de cultuur eerst op 100° verhit, afgewreven met Na Cl-oplossing 1 : 1000, en dan gecentrifugeerd.

In drie dergelijke proeven werden de volgende phagocytair indices verkregen:

A	6.9	5.2	4.8
B	3.5	2.6	2.6
C	0.16	0.34	0.4

Laat men dus, zooals in C, aan het serum niet de gelegenheid om vóór de verhitting voldoende tijd op de bacillen in te werken, dan is de phagocytose zeer gering, en men krijgt dan hetzelfde resultaat als wanneer men het serum eerst afzonderlijk verwarmt en het dan samen met de leukocyten aan de bacillen toevoegt. In B nu heeft het serum vooraf in verschen toestand op de mikroben gewerkt (daarom is $B > C$), maar toch heeft de daarop gevolgde verhitting de intensiteit belangrijk doen dalen ($B < A$). Veel duidelijker dan bij Wright's vroegere proeven met staphylococcen blijkt dus ook het gefixeerde opsonine hier niet ongevoelig voor hooge temperatuur. Voor Wright en Douglas blijft dit verschijnsel duister, en zij zeggen ervan: „The smaller phagocytic effect recorded in each experiment in B as compared with A is at present without explication.”

Bulloch en Atkin nu hebben ook den invloed nagegaan, dien hooge temperatuur op „geopsoniseerde” coccen 1) uitoefent, en zij vonden dat zelfs na eene verwarming van 5 uur op 60° de phagocyteerbaarheid dezer coccen nog zeer weinig was afgenomen. Ziehier een hunner tabellen:

Aantal coccen
per leukocyt.

1. versch serum (3 vol.) + coccen (1 vol.) + gewassen bloedlich. (3 vol.):	28
---	----

1) D. w. z. coccen, die gedurende 15 min. bij 37° met versch serum zijn gedigereerd.

	Aantal coccen per leukocyt.
2. verwarmd serum (15 min. 60°, 3 vol.) + coccen (1 vol.) + gewasschen bloedlich. (3 vol.):.....	0.1
3. geopsoniseerde coccen, 15 min. verward bij 60° (4 vol.) + gewasschen bloedlich. (3 vol.):..... enz., steeds langer verwarmd,	27
11. geopsoniseerde coccen, 5 uur bij 60° (4 vol.) + gewas- schen bloedlich. (3 vol.):.....	23.5

Wij zien in bovenstaande tabel dat, terwijl in 1 en 2 de volumina van coccen en bloedlichaampjes zich verhouden als 1 : 3, deze verhouding in 3 tot en met 11 bedraagt 4 : 3, terwijl bovendien in 2 het mengsel nog verdund is met 3 volumina van het bijna indifferente verwarmde serum. Nu is 't een bekend feit, door meerdere onderzoekers vastgesteld en waarvan ook ik mij heb kunnen overtuigen, dat, wanneer in een phagocytair mengsel de hoeveelheid mikrogen toeneemt, ook de phagocytair index wordt verhoogd. Dit doet nu weinig ter zake, wanneer slechts bij vergelijkende proeven constante hoeveelheden mikrogen worden gebruikt. Meenden nu Bulloch en Atkin misschien dat zij, om het totale volume hunner mengsels gelijk te doen blijven, in 3 tot 11 de 3 volumina serum van 1 en 2 gerust door 3 volumina coccen konden vervangen?! Met de volume-verhoudingen coccen: leukocyten = 1 : 3 zou het phagocytair gemiddelde in de mengsels 3 tot 11 belangrijk lager zijn geweest.

Aldus vooropstellende, dat de schrijvers in deze een principieele technische fout hebben gemaakt, kunnen wij wel de waarschijnlijkheid aannemen dat het op mikrogen gefixeerde opsonine minder gemakkelijk vatbaar is voor den destrueerenden invloed van hooge temperaturen, doch geenszins toegeven dat de thermolabiliteit zoo goed als verdwenen zou zijn. Wij vinden

in deze opvatting steun bij Hektoen en Ruediger (26), die wel degelijk de phagocyteerbaarheid van voorbehandelde coccen bij verwarming zagen afnemen. B. v.:

	Phagocytaire index:
1. geopsoniseerde coccen (streptococcen) + gewassen leukocyten:.....	16.0
2. geopsoniseerde coccen (verwarmd 30 min. bij 58°) + gewassen leukocyten:.....	4.2
3. geopsoniseerde coccen (verwarmd 30 min. bij 60°) + gewassen leukocyten:.....	2.5
4. verse coccen, niet verwarmd + gewassen leukocyten:	0.1

Ook Bächer (27) zag, dat met actief serum gedigeerde en dan verhitte coccen zeker een deel van hun phagocyteerbaarheid verliezen, waarna ze met vers serum niet sterker meer geopsoniseerd kunnen worden.

Er is echter nog een andere factor, dien wij hierbij in 't oog moeten houden, n.l. de invloed van langdurige verwarming of hoge temperaturen op de mikroben zelve. Wright vond ten deze (7) dat staphylococcen, vooraf verhit op 115° en daarna afgekoeld, evengoed gevoelig waren voor den opsonischen invloed van het serum als verse coccen. Uit vergelijkende proeven bleek intusschen (11), dat phagocytaire mengsels met levende tuberkelbacillen hogere indices gaven dan zulke met door hitte gedooide bacillen. Dit schijnt dus in tegenspraak met het voorafgaande. Herinneren we ons echter, dat Wright de t.b.c.-bacillen op 100° verhit en ze dan in 1 : 1000 NaCl-oplossing suspendeert, om agglutinatie tegen te gaan. Besredka nu heeft, voor zoover mij bekend 't eerste aangetoond, dat geagglutineerde mikroben gemakkelijker gefagocyteerd worden dan homogeen verspreide (28) 1). Dat agglutinatie en

1) „Les bacilles typhiques agglutinés par les sérums normaux sont mieux phagocytés que les bacilles non agglutinés.”

phagocytose twee processen zijn die elkaar onderling in de hand werken is een feit, dat mij bij mijne proeven telkens weer is opgevallen, en waarop ik nog nader zal moeten terugkomen. De conclusie ligt dus voor de hand, dat de zwakkere phagocytose der vooraf verhitte tuberkelbacillen niet te wijten is aan verlaagde opsoniseerbaarheid tengevolge van de verwarming, maar eenvoudiging aan verhinderend der agglutinatie. Ook Bächer (27) zag opsoninewerking evengoed tot stand komen op de vooraf verhitte als op de verse bacteriën.

Een schijnbaar afwijkend resultaat verkregen Bulloch en Atkin (25), die constateerden, dat staphylococcen, verhit tot 100° en daarboven, minder goed opsoniseerbaar waren; na verwarming gedurende 1½ uur op 134° bedroeg deze vermindering 50 %. De schrijvers verkleinen echter zelf meteen zelf de waarde hunner mededeeling door deze woorden: „It is possible, too, that the readings are really higher, as it is often very difficult to count the bacteria which have been subjected to such high temperatures on account of defective penetration of the stains employed.”

Ik heb zelf waargenomen, dat de vatbaarheid van miltvuurbacillen voor opsoninewerking door koken zeker niet wordt verminderd. Een en ander geeft ons het recht aan te nemen, dat de vermindering in phagocytbeerbaarheid van vooraf geopsoniseerde mikrogen onder den invloed van hooge temperaturen niet berust op veranderingen in de mikrogen zelf, maar op nog bestaande — zij 't ook minder sterk uitgesproken — thermolabiliteit *ook* van het gefixeerde opsonine.

Nog eene reeks andere fixatieproeven verdienen, in verband met het bovenstaande, nadere beschouwing. Hierbij werd nagegaan niet alleen hoe het contact met het serum op de mikrogen had gewerkt, maar ook wat

er dan van het serum geworden was. En dit gaf, in verband ook met andere verschijnselen, nieuwe gezichtspunten op het vraagstuk van de constitutie en de specificiteit der opsoninen. Zooals wij uit het volgende zullen zien, heeft de vraag of opsoninen met lysinen geïdentificeerd kunnen worden, de onderzoekers in 't bijzonder bezig gehouden — dezelfde vraag die wij ook in het voorafgaande hoofdstuk bij de behandeling der bakteriotropinen opwierpen.

Bulloch en Atkin dan vonden, dat normaal menschelijk serum, dat met een voldoende hoeveelheid staphylococcen is gedigereerd, zijn opsonisch vermogen voor deze microben totaal kan verliezen. De fixatie van het opsonine op de coccen zou geschieden zoowel bij 0° al bij 37°, een feit ook door andere onderzoekers gesignaleerd en waardoor de identiteit van opsonine en complement zou zijn uitgesloten — immers, het complement fixeert zich niet bij die lage temperatuur. Voorts behandelden de beide genoemde onderzoekers naast elkaar: een versch serum A en een op 60° verwarmd serum B beide met coccen (A¹ en B¹) en beide bij 0°, en centrifugeerden daarna. Het afgepipetteerde serum A had zijn opsonisch vermogen ongeveer geheel verloren. De conclusie dat „the opsonin is very different in type from a lysin, as apparently no complementlike body remains in the supernatant fluid after the serum has been digested at 0° C.,” is geheel ongemotiveerd, aangezien de schrijvers naar de eventueele aanwezigheid van complement in het gedigereerde serum geen speciaal onderzoek hebben gedaan; het zou er, ook volgens henzelf, juist in te verwachten zijn geweest, daar immers het complement bij 0° zich niet aan cellig materiaal bindt. Het is jammer, dat zij zich niet de vraag hebben gesteld, of de coccen dan misschien wel den normalen

staphylococcen-amboceptor uit het serum aan zich gebonden hadden. Immers: amboceptor-fixatie vindt wel plaats bij 0°, en de aanwezigheid van zulk een normalen amboceptor in menschelijk serum is a priori niet uit te sluiten. Bulloch en Atkin hadden dit kunnen uitmaken door na te gaan, hoe het met de phagocyteerbaarheid der coccen A¹ gesteld was (na wassching met zoutsolutie) in vergelijking met verse coccen; het ware dan gebleken of de coccen A¹ bij 0° iets uit het serum tot zich hadden genomen. De schrijvers deden deze proef wel met de coccen B¹, en constateerden dat deze, met gewasschen leukocyten samengebracht, slechts zwak phagocyteerbaar waren. Hunne conclusie hieruit, dat dus door de verwarming van het serum op 60° *al* 't opsonin was vernietigd, is zeker ongemotiveerd, te meer daar het gemiddelde aantal opgenomen coccen per leukocyt toch nog 4 bedroeg.

Hier volge nog het resultaat van een absorptieproef van Bulloch en Atkin, die in dit verband van belang is:

	phagoc. index
1. coccen, voorbehandeld met verwarmd serum + gewasschen leukocyten.....	0.5
2. coccen als 1, met versch serum nabehandeld + gewasschen leukocyten.....	15
3. normale coccen + versch serum, voorbeh. met de coccen van 2 + gewasschen leukocyten.....	0.4

De schrijvers verwaarloozen nu de waarden 0.5 en 0.4 van 1 en 3, terwijl men van uitblijven der phagocytose alleen dan mag spreken, wanneer deze werkelijk 0.0 bedraagt. Zij komen tot het besluit, dat het opsonine een antistof is van niet complexe constitutie, dat het bij inactiveringstemperatuur geheel wordt vernietigd, en niet in een niet-actieve modificatie (opsonoïd) wordt veranderd. Immers — zoo redeneeren zij —, ware dit laatste wel het geval, dan zouden de coccen van 1

niet bijna al het opsonine aan een versch serum kunnen onttrekken.

Indien Bulloch en Atkin nu eene eventueele complexiteit van het opsonine niet zoo spoedig hadden uitgesloten, en de mogelijkheid van het bestaan van een normalen amboceptor voor staphylococcen in normaal menschelijk serum (zij 't ook in geringe hoeveelheid) in het oog hadden gehouden, dan hadden zij de verklaring van de laatste proef aldus kunnen geven: in het verwarmde serum waarmede de coccen van 1 zijn voorbehandeld, is het complement vernietigd en de normale amboceptor blijven bestaan; deze laatste fixeert zich op de coccen en het resultaat is een zwakke opsoniseerende werking. De van normalen amboceptor voorziene coccen zijn nu in staat uit versch serum het complement tot zich te trekken, en het gevolg is eene versterking van de phagocyttaire reactie. In het zooeven genoemde versche serum is nu alleen de normale amboceptor overgebleven, die op zijn beurt slechts tot een zwakke opsoniseerende werking in staat is, — vandaar ook de overeenkomst van de indices in 1 en 3.

De opsonische invloed van normaalsera zou dus in hoofdzaak te danken zijn aan de werking van het complement, dat op de mikroben gefixeerd is door middel van den normalen amboceptor, die op zich zelf reeds in staat is een zwakke opsonische functie uit te oefenen. — Deze theoretische opvatting, het eerst door Dean in ietwat anderen vorm uitgesproken, zal in de volgende bladzijden nader worden uitgewerkt. Ik moest haar nu reeds hier inlasschen tot beter begrip der resultaten van verschillende nog te refereeren onderzoekingen, en ook om niet telken male in herhalingen te vervallen. Het zal blijken, dat het ons in dit geschrift voor een goed deel te doen is om het bewijs der stelling: com-

pleet opsonin = amboceptor + complement („ambo-complement”).

Hektoen en Ruediger (26) komen, in zake de constitutie van het opsonine, tot een ander besluit dan Bulloch en Atkin. Uit het feit, dat de index voor coccen zooals die in 2 van hun tabel op pag. 41, voorbehandeld met versch serum en daarna verwarmd, onder den invloed van nieuw versch serum slechts van 4.2 op 4.6 kon stijgen, concludeeren zij dat het opsonine twee groepen bezit: een *baptophore*, thermostabiel, die de fixatie op de bakteriën bewerkstelligt, en een *opsoniphore*, van haar functie berooft bij 56°. Is het opsonine eenmaal gefixeerd, geïnactiveerd of niet, dan blijven de betreffende bacterie-receptoren bezet, zoodat aan nieuwe opsoninen de toegang belet wordt (opsonoïdvorming).

De eerste die op grond van origineele experimenten met eene ietwat gewijzigde techniek, het opsonische serum-element tot de werking van reeds bekende anti-stoffen trachtte terug te brengen, was Dean (29). Deze onderzoeker wees er op, dat ook coccen die zijn voorbehandeld met geïnactiveerd normaalserum van den mensch of van verschillende dieren, steeds sterker gefagocyteerd worden dan niet voorbehandelde mikrogen. Er is dus nog iets van het opsonine in het verwarmde serum achtergebleven, of m. a. w. er heeft bij de verwarming op 56—60° slechts eene fractioneele destructie plaats gehad. De graphische voorstelling van Dean op pag. 47 demonstreert ons ten duidelijkste, hoe verwarming op 60° een snelle daling van het opsonisch vermogen zoowel van normaal als van immuunserum met zich brengt, waarna de waarden vrijwel constant blijven.

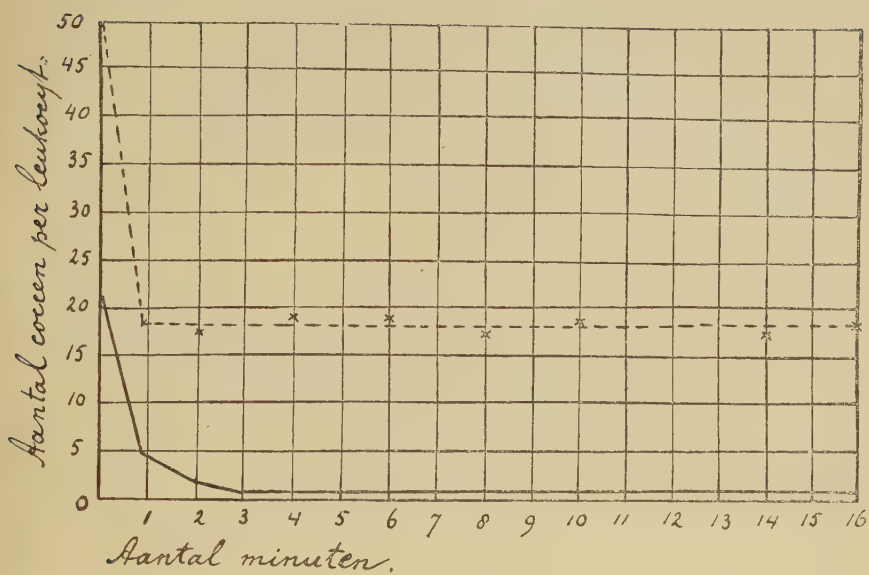


Fig. 1.

———— normaal konijnserum
 ----- staphylococcen-immuun-konijnserum

Zooals men ziet is bij het immuunserum de *thermostabiele* rest belangrijk groter dan bij het normaalserum, terwijl het verlies aan *thermolabiel* opsonine bij beide weinig verschilt. Komt dit niet treffend overeen met wat wij weten omtrent het gehalte van normale en immuunsera aan amboceptor en complement?

Dean heeft vervolgens nagegaan, of coccen, met normaal serum behandeld, ook nog het opsonine uit immuunserum kunnen opnemen: eene emulsie van staphylococcen werd met geïnactiveerd (25 min. bij 60°) normaal paardserum gedurende 15 min. bij 37° in contact gelaten; dan werd gecentrifugeerd, gedecanteerd en de coccen eenmaal met zoutsolutie gewasschen. Voorts werden in twee buisjes naast elkaar gelijke deelen van de gesensibiliseerde en van normale coccen met een

verwarmd (20 min. bij 60°) staphylococcen-immuunserum van een paard gedigereerd, gecentrifugeerd, en dan werd vergeleken het opsonisch vermogen van het verwarmde immuunserum en van dat waarmede resp. gesensibiliseerde en normale coccen waren behandeld. Ziehier de resultaten van twee dergelijke experimenten:

		Coccen, geteld in 22 leukocyten. Aantal coccen per leukocyt.
I.		
verwarmd immuunserum.....	24	} gemiddelden van 3 tellingen, elk van 22 leukoc.
hetzelfde, doch behandeld met gesensibiliseerde coccen.....	13	
hetzelfde, doch behandeld met normale coccen.	4	

II.	
Proef met eene verdunning van 1 op 5 van een dergelijk serum van grootere immuunkracht:	
Phagocytair index van de serumverdunning...	30
dito, na passage van geprepareerde coccen ...	24.4
„ „ „ „ normale „	8

Dean concludeert hieruit: „these two experiments seem to show that the cocci occupied by the substance from normal serum are incapable of taking up the substance from immune serum, whereas fresh cocci are capable of removing a large proportion of the substance.”

Dit nu is niet juist; er blijkt juist uit de cijfers, dat ook de geprepareerde coccen nog een deel van het opsonine uit het immuunserum hebben opgenomen. En wij kunnen dit ongedwongen aldus verklaren, dat de coccen in het normaal serum niet geheel met opsonine (in casu met normalen amboceptor) verzadigd waren, en dat zij wat daaraan nog ontbrak, aan het immuunserum hebben onttrokken, waardoor het opsonisch vermogen van dit laatste eenigszins daalde. Wanneer deze opvatting juist is, zou men bij de omgekeerde proef verwachten, dat coccen die eerst met immuunserum

zijn behandeld, zich hierin verzadigd hebben met amboceptor, en dus daarna uit normaal serum geen opsonine meer tot zich kunnen trekken. Uit de onderstaande cijfers schijnt echter het tegengestelde te blijken :

	Gemiddeld aantal coccen in 22 leukocyten.
III.	
normaal serum.	40
hetzelfde, behandeld met door immuunserum gepraepareerde coccen	30
hetzelfde, behandeld met versche, normale coccen	2.3
IV.	
normaal serum.	35
dito, behandeld met gesensibiliseerde coccen	27
„ „ „ normale „	2

Dean zegt hiervan: „These experiments seem to show that the cocci occupied by the substance from immune serum are incapable of taking up much of the substance from normal serum, whereas fresh cocci are capable of removing a large proportion of the substance.” (Men ziet dat de schrijver zich hier voorzichtiger uitlaat dan in zijn vorig citaat). Hoe is nu dit onverwachte resultaat te verklaren? De oplossing volgt uit de mededeeling van Dean zelf, dat hij in III en IV „instead of a normal heated serum a normal fresh unheated serum” heeft gebruikt. Hieraan hebben de gesensibiliseerde, d. w. z. de met immuunamboceptor beladen coccen een deel van het complement, d. i. een deel van het opsonisch vermogen kunnen onttrekken.

Hoewel Dean zich van eene speciale verklaring der proeven I—IV onthoudt, blijkt uit onze beschouwingen dat ze geheel passen in het kader der theoretische conclusies, waartoe hij — zooals wij zullen zien — komt.

Voorts bleek hem nog, dat voor streptococcen, typhus- en dysenteriebacillen het serum van een immuun paard,

versch of verwarmd, steeds hogere phagocytaire waarden gaf dan dat van een normaal dier.

Dean heeft dus aangetoond, dat de vernietiging van het opsonine ook in normaalserum bij inactiverings-temperatuur niet compleet is. Het thermostabiele residu houdt hij voor indentisch met den amboceptor. Van den amboceptor van immuunsera weten we immers, dat hij in staat is de phagocytose te bevorderen na zich op zijn antigeen te hebben gefixeerd. En waarom zou zulks, zij 't ook in geringeren graad, met den amboceptor van normaal serum niet even goed het geval kunnen zijn?

Voor het tot stand komen van een opsonisch effect is het complement dus niet noodzakelijk; wel kan het de werking van het immuunlichaam versterken: de snelle daling toch van den index bij inactivering van het serum gaat samen met de vernietiging van het complement.

Wij hebben Dean's eerste publicatie hier vrij uitvoerig behandeld, omdat zij een nieuw gezichtspunt op het opsoninenvraagstuk heeft geopend, en aanleiding heeft gegeven tot nieuwe onderzoekingen die klaarheid hebben gebracht in veel wat duister was.

Dean's proeven en conclusies beide zijn niet onaan-gevochten gebleven. Wright zelf is er tegen opge-komen (23). In de eerste plaats had Dean zich onthouden van den term „opsonin,” en steeds gesproken van „the substance” als afkorting van „the substance which prepares the micro-organisms for phagocytosis.” Hij deed zulks „in order to mark te danger that one might be led to regard the opsonin as actually a different substance, and not merely a property of immune serum.” Het schijnt mij van belang, een deel van de woorden

waarmede Wright zich daartegen verdedigt, hier weer te geven. Hij schrijft o. a.: „We submit that the clarification of the rôle of the blood fluids which was effected by us would have remained incomplete and ineffective if we had not alighted on the terms „opsonic power” and „opsonins,” or some other opposite and equally convenient nomenclature to denote, as the case may be, the power or „the substance in the serum which prepares the micro-organisms for phagocytosis.” We would also submit that the ultimate — and we hold for the present unapproachable question — as to whether the opsonic effect we have described is only one of a series of diverse effects exerted by a single *antitropic* substance, or whether it is the result of the specific activity of an independent chemical unit in the serum, is not prejudged by the employment of the term opsonin.” Het blijkt dus dat hij zelf niet te veel wil vasthouden aan de zelfstandigheid der opsoninen, en meent dat ook deze naam niets prejudicieert. — Dit, wat de terminologie betreft.

Met betrekking tot de quaestie van de totale thermolabiliteit der opsoninen, door Dean betwist, erkent Wright dat er ook bij toepassing van inactief normaal serum als milieu een zwakke phagocytose waarneembaar blijft. Hij met Douglas, zoowel als Bulloch en Atkin hadden dit feit eigenlijk verwaarloosd en gemeend, dat het toe te schrijven was aan sporen van verschrompt serum, die tengevolge van onvoldoende wassching van de leukocyten daaraan waren blijven kleven. Dit nu bleek onjuist, want ook na nog meerdere malen herhaalde wassching blijft dit verschijnsel bestaan. Juist deze „residual phagocytosis” had Dean er toe gebracht Wright’s stelling te bestrijden dat het opsonine als zoodanig thermolabiel is en dat er een totale destructie bij inactiveringstemperatuur plaats

vindt. Wright nu, die de thermolabiliteit niet wil laten vallen, meent dat de „residual phagocytosis” moet berusten òf op zoogenaamde spontaanphagocytose (d. w. z. phagocytose door gewasschen leukocyten zonder medewerking van serum), òf op phagocytose afhankelijk van de werking eener stof die weerstand heeft geboden aan de gewone inactiveringstemperatuur. De eerste mogelijkheid laten we hier buiten beschouwing, omdat we aan het vraagstuk der spontane phagocytose een afzonderlijk hoofdstuk zullen wijden; we zullen voor 't oogenblik alleen de vraag behandelen: thermolabiliteit of -stabiliteit?

Wright deelt mede, dat hij met Reid ook in geïnactiveerd serum van menschen die behandeld waren met tuberkel- en staphylococcen-vaccins, een stof vond, die zich als „incitor element” gedroeg en door de betreffende mikroben geheel uit het serum kon worden geëxtraheerd. Deze stof is dus bakteriotroop en niet leukocytotroop, en dus ook geen stimuline. Hij noemt ze „the opsonin found in the heated immune serum” en stelt ze op één lijn met de door Dean gevondene en óók met de bakteriotropinen van Neufeld.

Nu verschillen, naar onze theoretische opvattingen, immuunsera — wat de aanwezigheid van immuunstoffen betreft — slechts quantitatief van normaalsera. De thermolabiliteit, voor de eerste bewezen, geldt dan dus ook zeker voor de laatste. Uit eene reeks verdunnings- en inactiveringsproeven met immuunsera, waarvan de resultaten in eenige curven zijn neergelegd, besluit Wright nu 't volgende :

- 1°. dat onverwarmd immuunserum bij verdunning geleidelijk in opsonische kracht afneemt.
- 2°. dat bij 16-voudige verdunning van het immuunserum, *verwarmd na verdunning*, de phagocytose

reeds bijna 0 was, toen deze voor 't serum, *verdund na verwarming*, nog 1.7 bedroeg.

Wright's conclusie luidt, dat het opsonine ook van immuunserum, door verwarming wordt vernietigd bij voldoende verdunning van het serum.

Wij willen hierbij slechts de opmerking maken, dat ten slotte ook thermolabiliteit een relatief begrip is, en dat het zeer wel mogelijk is, dat bij sterke verdunning de amboceptor meer vatbaar wordt voor den destrueerenden invloed van hooge temperaturen dan in de normale concentratie van het serum. Bovendien hebben we toch in gewone omstandigheden met het serum als zoodanig te maken, en niet met verdunningen ervan.

Bovendien put Wright nog een argument uit onderstaande curve, waaruit, volgens hem, zou blijken, dat het immuunopsonine heliolabiel is, wat niet geldt voor andere thermostabiele immuunstoffen.

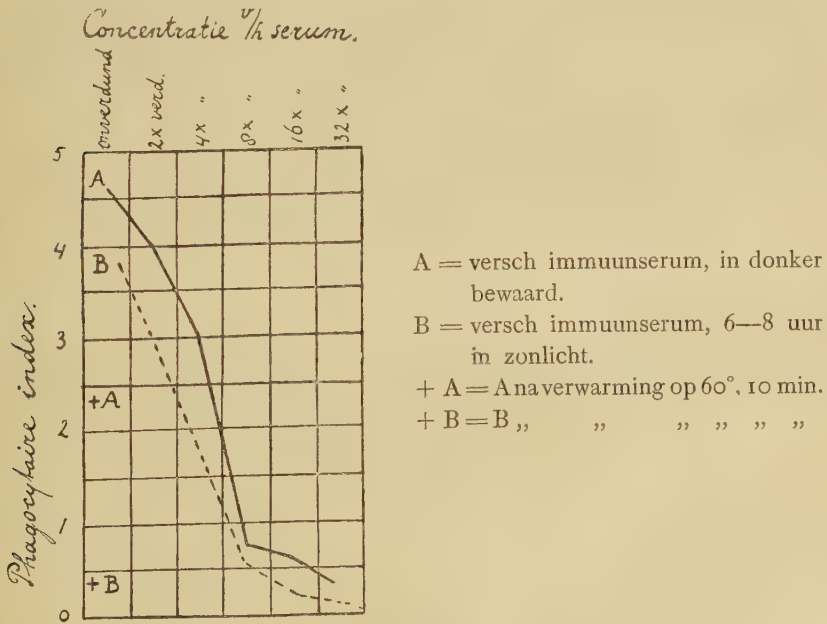


Fig. 2.

Hiertegen is naar mijne meening wel wat in te brengen. Het versche immuunserum A heeft door zijn verblijf in 't zonlicht eenvoudig zijn complement of een deel ervan verloren: de curven A en B loopten dan ook overigens ongeveer evenwijdig. Wat nu de verwarming van het serum betreft: wij moeten niet vergeten dat, zoodra men de officieele inactiveringstemperatuur van 56° te boven gaat, ook de amboceptor te lijden heeft, en dat zulks, volgens Bordet, 1) zeker geldt voor een temperatuur van 60° . In + A is dus minstens het geheele complement benevens een deel van den amboceptor vernietigd. Dit laatste is natuurlijk in + B nog verder gegaan: eene expositie aan zonlicht gedurende ± 7 uur, gevolgd door verwarming op 60° is een „tour de force,” waartegen zelfs een amboceptor niet bestand behoeft te zijn!

Wright heeft dan ook naar mijne meening slechts de betrekkelijkheid ook van het begrip der thermostabiliteit bewezen, doch het is hem niet mogen gelukken aan te toonen dat de opsoninen ook van immuunsera thermolabiel zijn in de beteekenis die wij gewoon zijn in de immuniteitsleer aan dat woord te hechten.

In hetzelfde stuk vindt Wright gelegenheid om, ook naar aanleiding van de door hem gevonden fixatie van het immuunopsonine op tuberkelbacillen en staphylococcen, op zijn beurt de stimulinentheorie een stoot te geven. Hij vindt den naam „unfortunate,” omdat:

- 1°. de wijze van werking van het „incitor élément” er door geprejudiceerd wordt (maar dit geschiedt met den naam opsonine eveneens!).
- 2°. de naam aanduidt, dat — in tegenstelling met alles wat wij in zake immuniteit weten — het

1) Mondelinge mededeeling.

organisme als reactie op entingen geen vaccino-trope doch leukocytotrope stoffen zou produceeren (dit argument werd ook reeds door Neufeld te berde gebracht).

Wij zagen hoe Dean den strijd over de autonomie der opsoninen inleidde. Wij zullen, in een der volgende hoofdstukken, aan dien strijd ook zelf deelnemen. Vooraf willen wij het phagocyttaire mengsel op zichzelf nader beschouwen, de beteekenis van elk der elementen daarvan in het licht stellen, en de technische vragen die zich daarbij voordoen, trachten te beantwoorden.

HOOFDSTUK IV.

HET PHAGOCYTAIRE MENGSEL. BETEEKENIS VAN ELK DER COMPONENTEN. — TECHNIEK.

Bij alle opsoninenonderzoek hebben we te doen met drie factoren: de mikroben (resp. erythrocyten en andere cellen of corpora aliena, — doch hierover later), de leukocyten en het milieu (serum of ander lichaamsvocht, physiologische zoutsolutie). Deze drie zijn alle variabele grootheden: er zijn dus zeer vele combinaties en uitkomsten mogelijk, en wij dienen van de eigenschappen der bekenden die wij in de reactie brengen wel zeer goed op de hoogte te zijn, willen wij ons in de verklaring der resultaten niet ter dege vergissen. Wij zullen nu bij de afzonderlijke behandeling van elk der drie componenten van het phagocytaire mengsel zien dat, hoewel elk hunner op zichzelf eene rol te vervullen heeft, deze toch steeds weer nauw verband houdt met die van de beide andere medespelers in het trio.

Wat nu in de eerste plaats de *mikroben* aangaat: we kunnen hier te doen hebben met verschillen in *aantal*, *soort* en *virulentie*.

Het aantal der mikroben in eene opsonische reactie, d. w. z. zeggen de dichtheid der gebezigde suspensie

is niet zonder invloed. Wright stelt dan ook zekere eischen daaraan: een 24-uur oude agarcultuur wordt met zoutsolutie geschud, en deze emulsie gecentrifugeerd, om eene homogene suspensie te verkrijgen. Deze behoort ± 7 milliard mikroben per cm^3 . te bevatten. Zijne phagocyttaire mengsels, waarvoor de volumeverhoudingen van serum, leukocyten en bakteriën gewoonlijk resp. 3—3—1 bedragen, bevatten dus ± 1 milliard mikroben per cm^3 .

Men moet dus het aantal mikroben in eene suspensie kunnen bepalen. Dit is natuurlijk mogelijk met behulp van de gewone plaat-kweekmethode, doch deze is niet te gebruiken voor zoover wij de suspensies versch gebruiken, want we zouden dan 24 uur op het resultaat moeten wachten. Wright (30) verzon nu een ingenieus middel, om spoedig tot eene betrouwbare telling te komen. Zijn gedachtengang wil ik hier weergeven:

„Given that a flock of sheep is to be counted, and that the members of that flock of sheep when turned out to pasture on a field of known area refuse to distribute themselves evenly over the pasturage, it becomes impracticable to arrive at the number of the flock by the method of counting heads on a series of small measured areas and multiplying the average number of sheep thus found by a factor corresponding to the fraction which the unit of area bears to the whole area of the field. In such a case it would be possible to introduce among and mix up thoroughly with the sheep before they were turned out a flock of goats containing a known number of individuals. This done, it would be practicable to arrive at the number of the sheep from a consideration of the relative number of goats and sheep enumerated on a series of small measured areas. It would be practicable — that is to

say, as long as no force came into operation to draw together into groups the similar elements in the mixed flock."

De schapen, die geteld moeten worden zijn in casu de bakteriën, en in plaats van de geiten neemt Wright erythrocyten.

In 1 c.M³. bloed bevinden zich $\pm 5,000,000,000$ roode bloedlichaampjes.

In 1 c.M³. eener 24-urige typhus-bouilloncultuur bevinden zich $\pm 1,000,000,000$ bacillen.

Deze getallen zijn dus van dezelfde orde. Men mengt nu een bepaald volume van de bakterieele suspensie met een gelijk volume bloed.

Hiervan worden uitstrijkpraeparaten gemaakt en gekleurd, de quantitatieve verhoudingen voor een aantal gezichtsvelden bepaald, en de berekening gemaakt.

Voorbeeld: we mengen 1 m.M³. bloed en 1 m.M³. van de suspensie. In 10 gezichtsvelden tellen we totaal 800 roode bloedlichaampjes en 1200 mikrogen, eene verhouding dus van 1 op 1.5. In 1 m.M³. bloed bevinden zich 5,000,000 erythrocyten; de suspensie bevat dus $1.5 \times$ dit getal = 7.250.000 mikrogen per m.M³.

Deze microscopische telmethode heeft, afgezien van het feit dat we haar dadelijk kunnen uitvoeren en niet 24 uur op het resultaat behoeven te wachten, nog andere besliste voordeelen boven de plaat-cultuurmethode, en wel deze:

- 1°. We berekenen aldus het aantal *individueele* elementen in eene cultuur, terwijl we bij de kweekmethode het aantal afzonderlijke *groepen* van eventueel geagglomererde mikrogen tellen. (Van belang b.v. voor staphylococcen en miltvuur).
- 2°. De kweekmethode leert ons alleen het aantal *levende* bakteriën of groepen van bakteriën kennen. Maar

ook de *dood*e microben in eene cultuur zijn van belang, immers, ook zij fixeeren opsonine even goed als de levende. Minstens even gewichtig is het om, bij het standaarddeeren van een vaccin, het totale aantal microben te kennen.

- 3°. Wanneer na eene voorloopige telling de suspensie te dicht blijkt, kunnen we haar op staanden voet naar wensch verdunnen.

Intusschen, dit alles moge bij bepaalde vergelijkende experimenten en vooral bij het maken van vaccins, zeer zeker zijne waarde hebben, bij de toch reeds tijdroovende opsonische techniek is eene eenvoudige methode voor het bereiden eener bruikbare suspensie zeer gewenscht. De mikroskopische telmethode van Alex. Klein zou ook hier waarschijnlijk goede diensten kunnen bewijzen. (92, 93) Ik voor mij heb in den loop van mijn werk de ondervinding opgedaan, dat eene 24-uur oude agarcultuur, geleidelijk aangelengd en geschud met 5 c.M³. steriele physiologische zoutsolutie (+ het condensiewater), en dan even gecentrifugeerd om grovere bakteriën-agglomeraties te verwijderen, een zeer bruikbare suspensie geeft voor mijne phagocytair mengsels, waarin ik de volumina van serum, bloed-lichaampjes en microben gewoonlijk gelijk neem.

Mc. Farland (94) heeft een apparaatje uitgedacht, dat hij Nephelometer noemt, en waarbij de dichtheid der voor de proef te gebruiken mikrobensuspensie wordt vergeleken met de standaardtroebeling van eene emulsie van bariumsulfaat. In principe is dit niets anders dan de methode van Boland (95), waarbij de generatieduur van bakteriën wordt bepaald door de troebeling van het medium te vergelijken met eene standaardemulsie van magnesiumsilicaat (talk).

Het staat nu wel vast, en ik heb mij daarvan meer-

malen kunnen overtuigen, dat — onder overigens gelijke omstandigheden — de intensiteit der phagocytose toeneemt met de dichtheid der gebezigde bacterieele suspensie. Aangezien nu de meeste schrijvers in 't geheel niet of slechts onnauwkeurig aangeven, hoe zij hunne suspensies hebben bereid, moeten we wel aannemen dat zij hiermede vrijwel naar willekeur hebben gehandeld. Zonder twijfel berusten de soms zeer hooge phagocytair indices voor een goed deel op het gebruik van te dichte bakteriën-suspensies. Vandaar de verwijten van onnauwkeurigheden bij de telling, die sommige onderzoekers tot elkander richten. Naar aanleiding van eenige opmerkingen van Dean over deze quaestie aan het adres van Wright, antwoordde deze, dat Dean met bakteriën-suspensies werkte, die vaak een gemiddelden phagocytair index opleverden van 50 en meer mikrogen per leucocyt. „Such a count is altogether incompatible with accurate quantitative work.” (23)

Bäcker (27) wijst er o. a. op van hoe groot belang de hoeveelheid mikrogen in het mengsel is: bij aanwezigheid van veel coccen in een milieu van inactief serum of zoutsolutie was de absolute intensiteit van de phagocytose grooter dan met weinig coccen in actief serum. Ter illustratie hiervan diene het volgende. Verschillende onderzoekers vermelden, dat miltvuurbacillen door cavialeukocyten reeds spontaan in sterke mate, doch nog krachtiger bij aanwezigheid van versch cavia serum worden gefagocyteerd. Ikzelf vond:

met versch serum: 97.5 % der leukocyten hebben gefagocyteerd,

met geïnactiveerd serum: 89 % der leukocyten hebben gefagocyteerd,

bij bereiding van bakteriën-suspensie en phagocytair mengsel, zooals ik boven heb aangegeven. Bäcker

echter vindt in een geval, eveneens bij gebruik van gelijke deelen serum, leukocyten en bakteriën in het mengsel: met versh serum 30 %;

met geïnactiveerd serum 4 % (serum verwarmd $\frac{1}{2}$ uur bij 63°!)

In andere proeven krijgt hij nog lagere cijfers. In het zooeven genoemde experiment echter maakte hij de mikrobensuspensie van slechts 3 oogjes cultuur op 5 c.M³. zoutoplossing, terwijl hij weer in andere gevallen eene gewone bouilloncultuur gebruikte, die voor deze reactie eveneens beslist te dun is. Het verwondert ons dan ook niet, dat wij in zijne protocollen bij dergelijke proeven opmerkingen lezen als: „In allen Präparaten sehr spärlich Bakteriën”, en „Durchwegs nur ganz vereinzelte Milzbrandfäden, daher keine Phagozytose.”

Bäcker is overigens zeer beslist in zijne kritiek op de telmethode van Wright en Douglas. Hij moet die „völlig ablehnen, als praktisch in den meisten Fällen ganz undurchführbar.” Bij hooge getallen acht hij de telling eenvoudig onmogelijk, en ook zelfs bij lagere cijfers onbruikbaar, aangezien de in de leukocyten opgenomen bakteriën ten gevolge van de intracellulaire digestie vaak spoedig haar kleurbaarheid verliezen, korrelig vervallen en zelfs opgelost kunnen worden -- en dit des te eerder, wanneer ze vooraf in actief serum zijn gedigereerd. 1)

Daarom gaat Bäcker anders te werk: hij telt 50—100 leukocyten en bepaalt het procentgehalte van die welke

1) Deze kritiek geldt minder voor miltvuurbacillen, dan wel voor de „teere” mikrobens: bacillen van de typhus-coli-groep en vibrionen. Overigens doen eenige voorloopige proeven met typhusbacillen, gefixeerd in formaline en daarna meermalen gewasschen, mij vermoeden, dat ook daarmede opsonische proeven zijn te verrichten. Bovendien doet zich daarbij het bezwaar van de snelle intracellulaire digestie niet gelden.

gephagocyteerd hebben; dit getal blijft onder gelijke verhoudingen vrijwel constant.

Intusschen moeten wij hier de opmerking maken, dat Bächer in zijn kritiek op Wright en Douglas wel wat ver gaat, waar hij zelf bij zijn werk een hunner voorschriften geheel negeert. Immers, ook de *duur van het contact* tusschen serum, leukocyten en mikroben is van belang. Wright neemt hiervoor 15 min. bij 37°, Bächer echter gewoonlijk $\frac{1}{2}$ uur of langer. En nu is 't een bekend feit, trouwens zeer natuurlijk, en waarvan men zich uiterst gemakkelijk kan overtuigen, dat, zoodra de phagocytose een aanvang heeft genomen (en dit geldt voor elken leukocyt afzonderlijk), deze met den duur van het contact voortschrijdt, totdat een zeker maximum is bereikt; de hoogte van dit maximum en de snelheid waarmede het wordt bereikt zijn weer afhankelijk van het opsonisch vermogen van het milieu en van de vitaliteit der leukocyten. Bovendien moet men niet uit het oog verliezen dat bij langer contact ook de intra-leukocyttaire digestie der opgenomen mikroben verder gaat. Wanneer Bächer zich dus in deze aan het voorschrift van 15 minuten contact der phagocyttaire mengsels had gehouden, dan zouden zijne indices lager en dus bruikbaar zijn geweest, en hij had zijne kritiek in deze in de pen kunnen houden.

Intusschen, voor klinische doeleinden moge het bepalen van den opsonischen index volgens de methode van Leishman-Wright groote waarde hebben waar het geldt het stellen der diagnose, het verkrijgen van prognostische gegevens en als handleiding bij het instellen eener specifieke therapie (waarbij dan de resultaten van een aantal opeenvolgende waarnemingen in eene curve worden uitgedrukt) — voor vele laboratoriumexperimenten, waarbij het niet om absolute cijfers

te doen is, zijn ook andere methodes geschikt om de intensiteit der phagocytose te bepalen en uit te drukken. Voor sommige mikrogen is zulks ter wille der nauwkeurigheid zelfs noodzakelijk, b.v. voor miltvuurbacillen, waarvan 't zoo moeilijk is eene homogene suspensie te verkrijgen. 1) Hier doet men beter, voor elke proef aan te geven welk procentgetal der leukocyten zich in phagocytair verband met anthraxbacillen bevindt. In andere gevallen echter, waar het niet op absolute cijfers aankomt, kan men volstaan met de intensiteit der phagocytose in de verschillende proeven vergelijkenderwijze te schatten, en deze schatting in teekens uit te drukken, b.v. op de wijze van Löhlein (31):

- o = geen phagocytair reactie
- + = beginnende, zwakke phagocytose
- ++ = middelmatige phagocytose
- +++ = krachtige phagocytose.

Ik voor mij heb mij niet aan eene bepaalde methode gebonden geacht, doch heb, naar gelang van de omstandigheden en het doel dat met elk experiment werd beoogd, een der drie methodes toegepast. 'n Enkele maal heb ik mij bepaald tot het met eenige woorden aangeven van het resultaat van elke proef. Men doe zulks echter alleen daar, waar de verschillen zeer sprekend zijn, en slechts na voldoende oefening in het beoordeelen van phagocytose-paeparaaten, anders loopt men de kans om — bij afwezigheid van den prikkel, om zich nauwkeurig in cijfers uit te drukken — de phantasie te doen meespreken. De resultaten van een onderzoek zooals dat van Neumann (33), waar het vaak op kleine verschillen aankwam, doch dat geheel

1) Wright heeft later het gebruik eener suspensie van miltvuursporen aanbevolen.

op deze wijze is weergegeven, laten den lezer dan ook op meer dan één plaats onbevredigd.

Ook de *soort* van het in eene opsonische reactie gebezigde mikroorganisme is van groot belang. Natuurlijk in de eerste plaats daar waar het geldt het stellen eener diagnose, d.w.z. het beantwoorden van de vraag of het opsonisch vermogen van een zeker serum ten opzichte van een bepaald mikroorganisme van het normale afwijkt. Doch ook op andere wijze bleek nog de beteekenis van de soort. Herinneren we ons, dat Wright een tiental door hem en Douglas onderzochte mikrobensorten in vier groepen verdeelde, daarbij als maatstaf nemende haar gedrag ten opzichte van de bakteriolytische en opsonische werking van normaal menschelijk serum. (c.f. pag. 17). We mogen hierbij echter niet uit 't oog verliezen, dat dit gold voor menschelijke leukocyten en normaal menschelijk serum. Meestal blijkt nu dat onderzoekers, die feiten vinden welke niet passen in het schema van Wright en Douglas, gewerkt hebben met leukocyten en serum van zeer verschillende dieren. Maar toch, ook wanneer door verschillende onderzoekers dezelfde ingredienten op dezelfde wijze gebruikt worden, zijn er toch nog wel uiteenlopende resultaten op te teekenen. Wij zullen de oorzaak daarvan trachten op te sporen.

Wright en Douglas (9), den invloed nagaande van versch en van geïnactiveerd menschelijk serum op de phagocytose van miltvuurbacillen door gewassen menscheukocyten, vonden daarbij:

1^e proef:

Vol. 3—3—1, 1) versch serum: „everywhere evidence of phagocytosis.”
verwarmd serum: „no signs of phagocytosis.”

1) De cijfers na Vol. beteekenen de in het mengsel gebruikte volumina resp. van serum, leukocyten en bakteriën.

2^e proef:

Vol. 2—2—I, versch serum: phagoc. index 2.4 („approximate only.”)
verwarmd serum: „ „ „ 0

Ik zelf vond:

Vol. 1—I—I, versch serum: 87% der leukocyten hebben	} gemiddelden van vijf bepalingen.
gephagocyteerd	
verwarmd serum: 57% der leukocyten hebben	
gephagocyteerd	

Bij den eersten aanblik schijnen deze cijfers moeilijk vergelijkbaar, omdat de intensiteit der phagocytose in deze proeven op zoo verschillende wijze is aangegeven, n.l. resp. in woorden, als indexcijfer en percentsgewijze. Het is mij echter hier om de werking van het verwarmde serum te doen, waarvoor de vergelijking bovendien gemakkelijk is, omdat de phagocytose daarbij in de twee eerste proeven 0 bedraagt, terwijl in mijn geval wel 57% der leukocyten hebben gephagocyteerd. Dit laatste nu kan niet alleen worden toegeschreven aan de relatief grootere hoeveelheid miltvuurbacillen in mijn mengsel, immers, in de 2^e proef van Wright en Douglas was de betrekkelijke quantiteit mikrogen in het mengsel ook reeds grooter dan in hun 1^e proef, en de phagocytose met verwarmd serum is er toch totaal uitgebleven. Het verschil wordt echter nog sprekender, wanneer ik vermeld, dat, indien ik in plaats van serum zoutsolutie aan het mengsel toevoegde, noch 38% der leukocyten phagocytose (d.i. dus spontaanphagocytose) vertoonden.

Er komt hier echter een andere factor in 't spel, namelijk de *virulentie* van de in het phagocyttaire mengsel gebezigde mikrogen. In het 2^e hoofdstuk hebben we reeds gezien dat Denys en Leclef en ook Neufeld en Rimpau, die allen met virulente streptococcen werkten,

constateerden dat deze bij aanwezigheid van normaal serum vrij bleven, doch slechts onder den invloed van immuunserum werden gefhagocyteerd. Dat de virulentie hier zelfs eene beslissende rol speelt en dat de mikrobensoort slechts een bijkomstigen invloed uitoefent, is 't eerst bewezen door Havet (34). Deze bracht hondleukocyten samen met bac. coli en een micrococcus: naar gelang van den virulentietoestand van deze twee werden òf geen van beide, òf een van beide òf beide tegelijk gefhagocyteerd. De phagocyt doet dus zijn keuze, welke door den graad van virulentie der betreffende mikroörganismen wordt bepaald. Bordet (35) verrijkte deze gegevens met een zeer demonstratief experiment. Virulente streptococcen, in de peritoneaalholte eener cavia gebracht, worden op 'n enkele uitzondering na door de weldra in grooten getale aanwezige leukocyten geweigerd, en vermeerderen zich ongehinderd. Spuit men nu in deze buikholte een cultuur van *Proteus vulgaris*, dan wordt deze in korten tijd totaal gefhagocyteerd. Bordet wijst erop, dat op deze door de phagocyten uitgeoefende selectie de methode berust om uit een mikrobengemengsel door middel van het dierexperiment eene reincultuur te verkrijgen. Marchand (36) verrichtte een grondig onderzoek in deze, en vond steeds een treffend paralellisme tusschen virulentie en uitblijven der phagocytose en het omgekeerde.

Het zou aanlokkelijk zijn op dit belangwekkende vraagstuk hier nader in te gaan. Ik houd mij nog bezig met proeven dienaangaande, en wil op de resultaten daarvan hier nog niet vooruitloopen. Enkele ervan zal ik meedeelen in hoofdstuk VII. Voor 't oogenblik zij het voldoende in verband met het voorafgaande de even korte als kernachtige uitspraak van Marchand aan te

halen, welke luidt: „Un streptocoque est virulent parce qu'il n'est pas phagocyté.”

Stiennon (37) heeft het bovenbeschreven experiment van Bordet herhaald met virulente miltvuurbacillen en bac. mesentericus, waarvan de laatste een gemakkelijke prooi werd der leukocyten, die echter de miltvuurbacillen onaangeroerd lieten.

Ook Löhlein (31 en 32), Hektoen (38) en Levaditi met Inmann (42), e. a., op wier werk wij trouwens nog terugkomen, wezen allen op de beteekenis van de virulentie der in de phagocytaire reactie gebezigde mikrogen — evenzoo bij proeven in vitro als in corpore. Het is dus, na al het voorafgaande, zeker geen ongegronde speculatie, wanneer wij — in zake het verschil tusschen Wright en mij bij de phagocytose van miltvuurbacillen door menschelijke leukocyten — aannemen, dat Wright's stam meer virulent was dan de door mij gebruikte.

Vast staat nu, dat avirulente mikrogen reeds door gewasschen leukocyten in eene indifferent milieu worden opgenomen, welk verschijnsel hoogstens in lichten graad wordt versterkt door normaalserum, welk laatste niet in staat is virulente mikroörganismen voor phagocytose geschikt te maken doch waarvoor immuunserum noodig is. Er zijn hier natuurlijk allerlei overgangen denkbaar, welke alle op een quantitatieve basis berusten. Met deze woorden bedoel ik dit: Wanneer wij spreken van virulent en avirulent nemen we grofweg twee uitersten, waartusschen tallooze stadia gelegen zijn van afgenomen avirulentie of van toegenomen virulentie. Eene alleszins betrouwbare, objectieve en quantitatieve methode voor het bepalen van den *graad* van virulentie van een mikrogenstam ontbreekt ons; het constateeren toch van het aantal uren binnen welke een dier van

bepaald gewicht aan de gevolgen van eene infectie met eene zekere hoeveelheid van de cultuur sterft, is eene methode die naar mijne meening aan billijke eischen niet voldoet. Wat ons hier op den goeden weg moet helpen is het feit dat de beide functies die wij virulentie en opsonisch vermogen noemen elkander quantitatief neutraliseeren.

↓

De onderzoeken van Wright c. s. zijn alle verricht met menschelijke leukocyten, meestal van den onderzoeker, soms ook van den patient. Dit schijnt bij oppervlakkige beschouwing niet onverschillig: zouden bij een lijder aan eene zware acute infectie ook de leukocyten niet een deel hunner vitaliteit hebben ingeboet? Voor het doel, dat wij met de klinisch-opsonische bepalingen volgens Wright beoogen, behoeven we ons om het antwoord op deze vraag niet te bekommeren. Jousset heeft volkomen gelijk, waar hij zegt (44): „homme ou animal, sujet sain ou malade, du sang ou d'un exsudat,” de herkomst der leukocyten, doet er niet toe. Immers, wij verrichten een dubbele proef, en de index vertegenwoordigt geen absoluut cijfer maar eene *verbouding*. Ook is het ons hierbij niet te doen om de vraag waartoe de leukocyten op zichzelf in staat zijn, maar wel waartoe zij in staat zijn bij aanwezigheid en onder den invloed van het te onderzoeken serum. Leukocyten en mikroben blijven in de beide vergelijkende proeven constant; het gaat hier slechts om de serumwerking. Voor ons echter, wien het te doen is om het wezen van het phagocytose-proces zelf, is deze vraag van het grootste belang: is het ook in absoluten zin onverschillig, welke leukocyten wij voor de reactie gebruiken, en reageeren ...

ook bij constant blijven van mikrogen en milieu — alle leukocyten op dezelfde wijze?

Het blijkt nu, dat het antwoord op deze vraag ontkennend moet luiden. Een coli-stam, zoo deelt Löhlein ons mee (31), die door cavialeukocyten in physiologische zoutsolutie niet werd opgenomen, werd in hetzelfde milieu door gewasschen menschelijke leukocyten krachtig gefhagocyteerd en tot granula gedige-reerd. Levaditi en Inmann (42) vinden de sensibiliteit van menscheukocyten grooter dan die bij andere individuen. Een virulente streptococcus b. v., die niet werd opgenomen door konijnleukocyten bij aanwezigheid van onverdund konijnserum, werd door leukocyten van den mensch nog gefhagocyteerd onder den invloed van eene tienvoudige verdunning van hetzelfde serum. Bij staphylococcen, waarvoor cavialeukocyten bedankten, zag Neumann (33) onder aanwending van menscheukocyten een flinke phagocytose optreden. Hij meent dan ook, dat „die menschlichen Leukocyten wahrscheinlich anders als die Meerschweinchenleukocyten beschaffen sind.” En bij zijne experimenten met normaalserum waren de resultaten van dien aard, dat hij deze woorden neerschreef: „es macht durchaus den Eindruck, als ob die Tätigkeit der Leukocyten allein ausschlaggebend sei.”

Uit een en ander blijkt dus wel, dat leukocyten van verschillende herkomst onder gelijke omstandigheden op dezelfde mikrogen toch geheel verschillend kunnen reageeren, en dat menscheukocyten het sterkste phagocytair reactievermogen bezitten.

In de hier volgende tabel heb ik nu voor een vijftal dieren in teekens weergegeven, hoe hunne leukocyten zich ten opzichte van den stam miltvuur-Brussel en in verschillend milieu gedragen. Er blijkt uit dat de

exsudaatcellen 1) als zoodanig ongewasschen, of na wassching in versch serum van het eigen dier of van een individu van dezelfde soort gesuspenderd, bij alle dieren maximale phagocytose vertoonen (3^e kolom).

I.	II. Zonder serum.	III. Versch serum.	IV. Inactief serum.
Cavia.....	+ + +	+ + +	+ + +
Konijn.....	+ +	+ + +	+ + +
Hond.....	+	+ + +	+ +
Kip	+	+ + +	+ +
Kikvorsch.....	o	+ + +	o

De verschillen komen voor den dag, waar de gewasschen leukocyten zoutsolutie of inactief serum tot milieu hebben. Vooral in het eerste geval (2^e kolom) vinden we alle graden van phagocytose vertegenwoordigd. Wij willen voor 't oogenblik slechts het feit constateeren en de oorzaak ervan, in verband met andere verschijnselen, later bespreken. Alleen zij hier nog opgemerkt, dat ook uit deze tabel blijkt, dat de phagocytose als zoodanig niet voldoende is om ons de verschillen in weerstandsvermogen der dieren tegen miltvuurinfectie te verklaren.

Nog enkele technische vragen vereischen hier eene behandeling. De opmerking is meermalen gemaakt, dat de herhaalde wassching voor de leukocyten lang niet

1) De leukocyten werden verkregen uit cellige peritoneaalexsudaten, die bij de dieren werden opgewekt door daags te voren een mengsel van gelijke deelen bouillon en zoutsolutie in te spuiten, in hoeveelheden afhankelijk van de grootte van het dier.

onverschillig zou zijn, en dat (zooals ook weer uit bovenstaande tabel zou blijken) in elk geval de leukocyten van verschillende dieren op deze manipulaties niet op gelijke wijze zouden reageeren. Dat deze rede-neering onjuist is, dat we hier niet te maken hebben met verminderde vitaliteit van sommige leukocyten-soorten ten gevolge van de behandeling, doch dat de onderlinge verschillen in de intensiteit der phagocytose in de 2^e en in de 4^e kolom van onzen tabel ten nauwste samenhangen met aan de leukocyten inhaerente eigenschappen blijkt wel hieruit, dat toevoeging van slechts een spoor van het eigen verse serum voldoende is, om bij *alle* de maximale phagocytose te voorschijn te roepen.

Wij moeten voorts nog de vraag onder de oogen zien, of de oplossing van citras natricus in physiologische zoutsolutie, waarmede we bij de Wrightsche techniek het bloed mengen om stolling te voorkomen, de leukocyten niet zou kunnen schaden. Hamburger en Hekma (45), die een uitvoerig onderzoek verrichtten over de quantitatieve verschillen in de phagocytose van koolpartikeltjes door paardleukocyten in verschillende milieux vonden, dat in eene oplossing van 1—2 % citr. natr. in physiologische zoutsolutie van 0.9 % NaCl het phagocytair vermogen totaal wordt onderdrukt. Het komt weer gedeeltelijk voor den dag na overbrenging van de leukocyten in 0.9 % NaCl-oplossing, maar er is een blijvend verlies in de intensiteit der phagocytose te constateeren, en wel: bij 1 % citr. natr. van 24 %, en bij 2 % citr. natr. van 30 %.

Wright nu heeft in zijn eerste publicatie met Douglas (7) deze quaestie reeds behandeld. Hij zag dat bij menscheleukocyten de phagocytose eerst werd onderdrukt bij eene concentratie van 3 % citr. natr. In elk geval:

„we took the precaution to add to the blood in comparative experiments precisely the same amounts of citrate of soda.” En voorts: „It may be noted that the morphological structure of the white corpuscles is extremely well preserved, and phagocytosis proceeds actively in a medium containing up to 1.5 per cent of citrate of soda.” Bij het gebruik van eene oplossing van 1 % citraat was er na eenige uren nog geen wijziging in de intensiteit der phagocytose opgetreden, terwijl zelfs na drie dagen het phagocytair vermogen niet gedaald was tot beneden $\frac{1}{2}$ of $\frac{1}{3}$ van dat van versch bloed. Van een schadelijken invloed van het citraat in deze concentratie was dus niet veel te bespeuren.

Hamburger en Hekma merken nu, naar aanleiding van hunne resultaten, op, dat men „bij het onderzoek in vitro van het gedrag van phagocyten tegenover bacteriën . . . bij verschillende experimenten . . . den graad der osmotische concentratie van het medium over het hoofd heeft gezien. Deze behooren dus herhaald te worden.” Of de schrijvers daarmede ook de opsoninenonderzoekingen op het oog hebben, voor zoover daarbij van oplossingen van citras natricus gebruik is gemaakt, blijkt niet duidelijk, doch het is wel waarschijnlijk, want bij hunne citraatproeven verwijzen zij naar het werk van Wright. — Het wil mij echter voorkomen, dat deze noodzakelijkheid geenszins bestaat. Afgezien nog van het feit dat de paardleukocyten geen menscheukocyten zijn (vergelijk de verschillende resultaten van Wright en Hamburger-Hekma), en koolpartikeltjes geen microben, kunnen wij het tegenwoordig best af met eene oplossing van slechts 0.5 % citraat in zoutsolutie. Voorts worden, nadat het citraat om de stolling van het bloed te voorkomen zijn dienst heeft verricht, de leukocyten niet — zooals bij Hamburger

en Hekma — uit de citraatoplossing eenvoudig in zoutsolutie overgebracht, doch wordt al het overtollige verwijderd door minstens $2 \times$ nawasschen van het bloed met physiologische keukenzoutoplossing. En ten slotte: wanneer we slechts, op 't voetspoor van Wright, bij vergelijkende proeven steeds zorg dragen dat de phagocytaire mengsels op dezelfde wijze wordt behandeld, dan kan ons geen verwijt treffen en dan zal ook het verhoudingscijfer waarom het ons te doen is, aan de werkelijkheid beantwoorden.

Het is mijne ondervinding, evenals die van verschillende andere onderzoekers, dat het geheel overbodig is om, in navolging van Wright, het phagocytaire mengsel op 37° te verwarmen. Zoowel de fixatie van het opsonine op de mikroben als de phagocytose komen beide even goed tot stand bij kamer- als bij broedtemperatuur; zelfs de snelheid dezer reacties schijnt in beide gevallen nauwelijks te verschillen. Dit vooropstellende doet de temperatuur er nog te minder toe, waar het vergelijkende bepalingen geldt, wanneer wij slechts — ik herhaal het — zorg dragen, dat er voor de objecten der vergelijking dezelfde uitwendige voorwaarden van contactduur en temperatuur heerschen.

In zake de wijze van inactivering der sera, door verschillende onderzoekers toegepast, hebben wij aan het slot van het vorige hoofdstuk met betrekking tot Wright reeds enkele opmerkingen gemaakt. Het is verwonderlijk hoe weinig stelselmatig men hierin te werk gaat, en hoe zelden men zich aan het voorschrift: $\frac{1}{2}$ uur bij 56° , houdt. Nu is het volkomen waar dat een korter durende verwarming bij ietwat hogere temperatuur ongeveer gelijk resultaat geeft. Veelal

echter heeft men de betreffende sera verwarmd gedurende langeren tijd, en zelfs boven 60° (b.v. $\frac{1}{2}$ uur bij 65° , Bächer). Dan wordt echter de amboceptor beslist gemodificeerd. Ook Hektoen (38) waarschuwt tegen te hooge inactiveringstemperatuur en geeft als voorbeeld: »Immune typho-opsonin resists to heat. Considerable destruction is accomplished by heating at 60° for half an hour.« Waar het nu te doen is om de overeenkomst van amboceptor- en thermostabiël-opsoninewerking te bestudeeren, daar is het zaak om deze stoffen bij onze ingrepen zoo veel mogelijk intact te laten. Bij immuunsera, met hun hooger gehalte aan thermostabiele immuustoffen is eenig verlies van minder overwegend belang; bij een normaal serum echter is dit belang zeer groot. Hier toch wordt bij te sterke of te langdurige verwarming met den normalen amboceptor tevens de thermostabiele rest van het opsonine vernietigd, en dit geeft, bij afwezigheid van eenig appreciabel opsonisch effect van zulk een serum aanleiding tot onjuiste voorstellingen omtrent thermolabiliteit en thermostabiliteit der opsoninen.

In den loop van mijn werk heb ik aanleiding gevonden tot het brengen van enkele kleine wijzigingen in de techniek van Wright.

Voor het opvangen en wasschen van het bloed heeft men, naar mijne meening, geen speciaal omgebogen buisje noodig; ik gebruik daarvoor eenvoudig een centrifugebuisje. Voorts doe ik de phagocytose niet tot stand komen in een capillair uitgetrokken pipetje, doch in een voldoende diep uitgehold objectglas, dat met een dekglasje en een laagje vaseline (precies als bij den hangenden druppel) wordt afgesloten, en in de holte waarvan de drie druppels van het mengsel een

plaats vinden. De menging breng ik tot stand door omroeren met een patinaoogje vóór en na het contact. Men vermijdt dan het dichtsmelten en afbreken van de punt van het pipetje, het telkens opzuigen en uitblazen van het mengsel, er bestaat minder gevaar voor infectie van de omgeving, en het procédé is er eenvoudiger op geworden. Of het ook dezelfde resultaten geeft? Dit was wel a priori te verwachten, doch ik heb mij daarvan natuurlijk overtuigd. Zie hier een voorbeeld: Patient F., man, 19 jaar, lijder aan febris typhoïdea. Bac. typhi gekweekt uit het bloed. Widal positief: $\frac{1}{400}$.

Opsonische index (voor bac. typhi, stam Gelsenkirchen): bepaald volgens de Wright'sche methode: 0.4

» met mijne gewijzigde techniek: 0.3.

Zooals wij gezien hebben, neemt Wright van de gewassen en gecentrifugeerde bloedlichaampjes de bovenste lagen, en gebruikt deze voor de phagocytose, omdat daarin de groote meerderheid der leukocyten opgehoopt ligt. Ik voor mij behelp mij gewoonlijk met zeer weinig bloed, en gebruik alle gecentrifugeerde bloedlichaampjes, roode en witte, goed dooreengeschied, waarvan ik een druppel aan elk phagocytair mengsel toevoeg. Maakt men nu hiervan, na afloop van het contact, gewone uitstrijkpraeparaten dan moet men veel te lang zoeken naar een voldoende aantal leukocyten. Om deze nu toch gemakkelijk bij elkaar te krijgen, pas ik een truc toe die een van Wright's assistenten mij in diens laboratorium demonstreerde. Van het mengsel brengt men een paar oogjes op het linker einde van een objectglas, en met een in scherpen hoek daartegen geplaatst dekglasje strijkt men de massa — op de wijze van de gewone bloedpraeparaten — geleidelijk over het objectglas uit; op het rechter einde van dit laatste, aan de grens van het uitgestreken laagje, vindt men nu

bijna alle leukocyten bij elkaar, die, door welke physische oorzaak dan ook, het langst aan het dekglasje zijn blijven hangen. 1)

Terwijl Wright zijne praeparaten fixeert in verzadigde sublimaat-oplossing en ze kleurt volgens Leishman-Romanovsky, heb ik mij steeds zeer wel bevonden bij de gewone alcohol-aetherfixatie en kleuring (behalve natuurlijk bij tuberkelbacillen) met gesatureerde waterige Toluïdinblauw-oplossing.

Hier volge ten slotte punt voor punt het relaas van de geheele bewerking, zooals ik die steeds met goed gevolg toepas:

1. Met een Francke'sche naald krijgt de patient resp. het dier een prikje in de lege artis gereinigde vingertop of oorlel. Enkele druppels bloed hieruit worden opgevangen in een centrifugebuisje, dat gevuld is met eene oplossing van 0.5 % citras natricus in 0.9 % NaCl-oplossing. Men schudt en centrifugeert.
2. Inmiddels zijn in twee of meer andere ledige centrifugebuisjes enkele druppels bloed opgevangen van den patient en van een normaal individu, resp. van een ander dier of van zoovele als van welker sera men het opsonisch vermogen wil bepalen. Scheidt het serum zich niet spoedig genoeg af, dan worden ook deze buisjes gecentrifugeerd.
3. Na centrifugatie van het buisje met de bloedlichaampjes in citraat-oplossing wordt deze laatste afgepi-

1) Het blijkt, dat deze waarneming in 1902, dus reeds vóór de eerste publicatie van Wright en Douglas ('03), is meegedeeld door Capt. S. P. James (97) naar aanleiding van een malaria-onderzoek: „In a well spread film nearly all the leucocytes will be found distributed along the edges and in the tags at the end of the film. If these parts of the slide are examined first, practically all the leucocytes in the film can be counted.”

petteerd, zuivere physiologische zoutsolutie toegevoegd, geschud, gecentrifugeerd, en deze wassching 2 of 3 maal herhaald.

4. De zoutsolutie van de laatste wassching wordt afgezogen, de koek van bloedlichaampjes op den bodem met 'n paar druppels versche zoutoplossing aangelengd en goed gemengd.
5. Van deze emulsie brengt men in uitgeholde objectglazen telkens 1 druppel samen met 1 druppel van de inmiddels volgens het voorschrift op pag. 59 bereide bakteriënsuspensie, en voegt daaraan toe resp. 1 druppel van de verschillende sera waarvan met het opsonisch vermogen wil bepalen. Men roert met een platinanaald, sluit de holte met een dekglas op een laagje vaseline en laat het mengsel gedurende 15 minuten aan zichzelf over.
6. Dan neemt men het dekglas af, roert wederom, vervaardigt de praeparaten zooals boven is aangegeven, beziet ze met immersie, telt en bepaalt den phagocytairen en den opsonischen index.

Elk dezer voorschriften is op zichzelf eenvoudig genoeg. Toch is er natuurlijk ook hier voldoende vóór-oefening noodig, om tot betrouwbare resultaten te komen. De zaak is echter gelukkig niet zoo hopeloos als Broers het voorstelt (96), die meent dat Wright's techniek voor continentale onderzoekers te moeilijk zou zijn. Hoewel de bedoeling van zijn eisch, „dat de methode voor het bepalen van den opsonischen index wat meer worde aangepast aan de methoden van onderzoek, die algemeen in de vastelands-laboratoriën worden gevolgd,” niet zeer duidelijk is, hoop ik daaraan in het voorafgaande toch eenigermate te hebben voldaan.

Aan mijne verdere experimenten met normaal- en immuunserum, en mijne daaruit en uit de betreffende litteratuur gevormde opvattingen omtrent de beteekenis der sera in de phagocyttaire mengsels — daaraan willen wij een tweetal afzonderlijke hoofdstukken wijden.

HOOFDSTUK V.

OVER NORMAAL SERUM ALS MILIEU, EN OVER DEN BOUW VAN
HET NORMALE OPSONINE.

Bij onze uiteenzettingen volgen wij den gewonen weg, waarlangs onze kennis der biologische verschijnselen pleegt voort te schrijden. Wij leeren deze daarbij steeds verder ontleden: uit het complex van in onderlinge wisselwerking verkeerende agentia isoleeren we de afzonderlijke factoren en bepalen het aandeel van elk hunner in het tot stand komen van het verschijnsel als geheel.

Wij hebben in het voorafgaande hoofdstuk getracht de beteekenis van mikroben en leukocyten in het phagocyttaire mengsel aan te geven. Er rest ons dus een onderzoek naar de beteekenis van het milieu.

De vraag is nu, of we in bepaalde omstandigheden een directe chemische verwantschap mogen aannemen tusschen leukocyt en object resp. een of meer hunner zijketenen (d. w. z. chemisch vrije bindingsaffiniteiten), dan wel of er steeds eene intermediaire stof optreedt — den oorsprong dezer stof voor 't oogenblik in het midden latende — die de binding tusschen leukocyt en object, en aldus de phagocytose, tot stand doet komen. In het laatste hoofdstuk zullen wij, bij de behandeling

der spontaanphagocytose, deze vraag nader onder de oogen zien. Uit het voorafgaande is voldoende gebleken, dat zoowel normale als immuunsera zulke intermediaire stoffen herbergen. Laat ons zien, op welke gronden nieuwere onderzoekers en ook wijzelf gemeend hebben, dat aan deze stoffen — men moge ze dan al of niet met den naam „opsoninen” bestempelen — geen zelfstandige plaats in de rij der autonome immuunstoffen toekomt.

Wenden wij ons eerst tot de opsoninen der normale sera.

Reeds in den zomer van 1906 heb ik in Metchnikoff's laboratorium een onderzoek verricht (46) 1) naar de opsonische kracht van het serum van een dier ten opzichte van mikroben tegen welke dit dier eene natuurlijke immuniteit bezit, en ik bediende mij in casu van *Rana esculenta* en *bac. anthracis*.

Het verkrijgen van een voldoende hoeveelheid leukocyten gaat hier niet zoo gemakkelijk als bij warmbloedige dieren. De lymfhezak levert te weinig witte bloedcellen en de peritoneaalexsudaten zijn slechts dan eenigszins rijkelijk, wanneer men 3—4 uren vóór de proef in de buikholte eenige kubieke centimeters inspuit van een mengsel van gelijke deelen bouillon en physiologische zoutsolutie. De exsudaatcellen worden dan op de gewone wijze door wasschen in de centrifuge van de lichaamsvochten ontdaan. De phagocytose bestudeerde ik in den hangenden druppel die bestond uit: één druppel leukocyten-suspensie, één oogje eener emulsie van miltvuurbacillen in bouillon of zoutsolutie, met of zonder een druppel serum. Bij

1) Buiten mijn schuld werd de publicatie tot in December van het vorig jaar vertraagd.

alle proeven werd steeds een contrôle-mengsel met ongewasschen leukocyten bereid.

Vooreerst kon ik nu constateeren, dat men kikvorsch-leukocyten door 2—3 maal wasschen in zoutsolutie geheel van hun phagocytair vermogen kan berooven. (Zie ook de tabel op pag 70.) Voegt men nu aan het indifferente mengsel (gewasschen leukocyten, bacillen, zoutsolutie) eene minimale hoeveelheid versch kikvorsch-serum toe, dan worden de leukocyten gereactiveerd en beginnen dadelijk de bacillen op te nemen. Deze laatste, vrij gelijkmatig verspreid in de praeparaten met zoutsolutie alleen, worden dadelijk door het versche serum geagglutineerd. Naast geïsoleerde phagocyten, bezig met het verslinden van miltvuurbacillen of -filamenten, vindt men bacillen-agglomeraties te midden waarvan men leukocyten in volle actie aantreft. Deze praeparaten verschillen in niets van die met ongewasschen leukocyten.

De toevoeging van versch serum aan het indifferente mengsel heeft dus twee afzonderlijke reacties ten gevolge: phagocytose en agglutinatie. Dit wil dus zeggen, dat er in versch kikvorschserum een opsonine en een agglutinine is voor miltvuurbacillen. Ook zou stimulinewerking op de leukocyten a priori niet zijn uit te sluiten. Ik moest dus nagaan, met hoeveel verschillende serumfuncties men hier te doen heeft, en of deze experimenteel van elkander te scheiden zijn. Met dit doel heb ik versch kikvorschserum op 56° geïnactiveerd, en het bleek dat dan het opsonisch resp. stimulerend vermogen verdwenen was. Het agglutineerend vermogen blijft echter behouden: in de praeparaten met verwarmd serum vindt men geagglutineerde microben, doch de leukocyten blijven onbewegelijk of zenden hoogstens pseudopodiën uit, zonder zich echter van

bacillen meester te maken. Het agglutinine wordt eerst bij verhitting op 70° vernietigd; zulk een serum gedraagt zich in het phagocytair mengsel, in biologischen zin, als zoutsolutie.

Er zijn dus minstens twee antistoffen in kikvorschserum aanwezig, die door inwerking van verschillende temperaturen van elkander gescheiden kunnen worden, of m. a. w. we hebben hier te doen met een thermostabiel agglutinine en een thermolabiel opsonine. Dit laatste verdient eenige nadere beschouwing. Wanneer wij in het onderhavige geval de rol van het serum bij de phagocytose aan een bijzondere stof toeschrijven die eene betrekking tot stand brengt tusschen phagocyt en bacil — die als *trait d'union* tusschen deze beide fungeert — dan dient men zich te vergewissen of deze stof hare werking op beide gelijkelijk uitoefent, dan wel of ze eene bijzondere affiniteit tot een van beide bezit. Praepareert ze den bacil, of stimuleert ze den leukocyt, of doet ze beide? Het is daarom noodig, de werking van het serum op elk der twee factoren afzonderlijk te bestudeeren.

Indien men nu de leukocyten na de wassching weer met versch kikvorschserum behandelt, dan geeft men hun juist terug wat de wassching hun heeft ontnomen. Zooals te verwachten was keert het phagocytair vermogen dan ook weer terug. Wascht men ze daarna weer, dan worden de leukocyten wederom even inactief als ze na de eerste wassching waren. Van eenige blijvende binding van serumstimuline is niets te bemerken, en we kunnen een dergelijke specifieke werking hier dan ook wel uitsluiten. Wanneer men echter miltvuurbacillen met versch kikvorschserum korten tijd in contact brengt, dan centrifugeert, het serum afpipetteert, en de mikrogen daarna met zoutsolutie wast, dan

blijken deze voor *gewasschen* leukocyten in een *indifferent* milieu een gemakkelijke prooi geworden te zijn. De fixatie van het opsonine (in den waren zin van dit woord) op de bacillen is dus bewezen. Dit is het primaire, en eerst secundair, nadat deze fixatie heeft plaats gehad, kunnen we spreken van eene stimuleerende werking op de leukocyten.

Hetzelfde verschijnsel, dat wij hier aantoonen voor normaalserum, hebben Neufeld en Rimpau ook geconstateerd voor hunne streptococcen- en pneumococcen-immunsera. Wij mogen dan ook wel aannemen, dat de versterking van de phagocytose door immunsera welke Metchnikoff voor een goed deel aan stimulinen blijft toeschrijven, in werkelijkheid geheel en alleen berust op de secundaire functie der primair aan de leukocyten gebonden opsoninen.

De boven beschreven verschijnselen gelden ook voor gedooide (op 100° C. verhitte) miltvuurbacillen. Op karmijnpartikeltjes echter fixeert zich geen opsonine.

Hier volgt het schema mijner bevindingen:

- | | |
|--------------------------------------|---|
| I. Ongewasschen leukocyten. | } agglutinatie
sterke phagocytose |
| miltvuurbacillen | |
| serum resp. exsudaatvocht | |
| II. Gewasschen leukocyten | } mikroben gelijkmatig over het
praeparaat verspreid, geen agglu-
tinatie, geen phagocytose, leu-
kocyten zonder pseudopodiën. |
| bacillen | |
| physiol. zoutsolutie | |
| III. Gewasschen leukocyten | } sterke agglutinatie, alle aan-
wezige polynucleairen hebben
mikroben opgenomen. |
| bacillen | |
| versch serum | |
| IV. Gewasschen leukocyten | } agglutinatie, leukocyten rond,
geen phagocytose, |
| bacillen | |
| op 56° geïnactiveerd serum. | |

V. Gewasschen leukocyten .	} geen agglutinatïe, geen spoor van phagocytose.
bacillen	
op 70° verwarmd serum .	
VI. Gewasschen leukocyten .	} sterke agglutinatïe; in de bacillenmassa's leukocyten met amoeboïde bewegingen en krachtige phagocytose.
bacillen, met versch serum	
voorbehandeld, en daarna	
gewasschen	
zoutsolutie	

In de laatste proef lezen wij, dat opsonine en agglutinine beide aan de bakteriën zijn gebonden. Deze binding nu is quantitatief. Het blijkt namelijk van de hoeveelheid bacillen af te hangen, of een serum waarmede men de bacillen heeft behandeld, daarna nog al of niet phagocytose-bevorderend werkt.

Men zou nu het bezwaar kunnen opwerpen dat de leukocyten van de herhaalde wassching zooveel te lijden hebben, dat dit de reden van het uitblijven der phagocytose is. Kan men echter met recht verwachten, dat verminderde vitaliteit ten gevolge van niet alleen chemische maar ook mechanische laesies eenvoudig en oogenblikkelijk door serum zou kunnen worden geneutraliseerd? Het zou nu nog mogelijk kunnen zijn, dat de leukocyten, in versch serum als physiologisch milieu overgebracht, zich kunnen herstellen, hetgeen in casu in inactief serum als niet meer natuurlijk milieu ook niet meer mogelijk zou zijn. Intusschen, dat het minder op het milieu als geheel aankomt, dan wel op de aanwezigheid daarin van bepaalde stoffen blijkt wel uit het feit, dat ook in zeer sterke verdunning van het versche serum met physiologische zoutsolutie de phagocytose door gewasschen leukocyten nog tot stand komt, terwijl verwarmd serum in de normale concentratie zonder werking blijft. Maar het sprekendste bewijs tegen het genoemde vitaliteitsbezwaar ligt wel

in proef VI, waar de geopsoniseerde en van alle overtollig niet-gefixeerd opsonine door wassching bevrijde bacillen, door *gewasschen* leukocyten in een milieu van physiologische zoutsolutie *gretig* worden opgenomen. Peritoneaal exsudaat en vocht uit de lymfhezak van de kikvorsch, door centrifugatie van cellen bevrijd, hebben eene opsonische werking evenals het versche serum.

Het is nu een opmerkelijk feit (en hier verwijs ik nog eens naar de tabel op pag. 70), dat, om twee uitersten te nemen, de leukocyten van de cavia, een voor miltvuurinfectie zoo gevoelig dier, zelfs na vijf en meer opeenvolgende wasschingen gemakkelijk miltvuurbacillen opnemen, terwijl leukocyten van de kikvorsch, een tegen miltvuur immuun dier, reeds na tweemaal wasschen geen phagocytose van bacillen van denzelfden stam meer vertoonen.

Hoe deze schijnbare tegenstrijdigheid te verklaren? Wij hebben er reeds op gewezen, dat we aan verminderde vitaliteit der kikvorschleukocyten niet behoeven te denken. Andererzijds mogen wij wel aannemen, dat na eene vijfmaal en meer herhaalde wassching de cavialeukocyten wel bevrijd zijn van het opsonine dat nog aan hun oppervlak mocht zijn blijven kleven. Zoo worden wij dan ook noodzakelijkerwijze tot de onderstelling gevoerd, dat sommige leukocytensoorten, zooals die van de cavia, bij afwezigheid van opsonine in het medium, in staat zijn dit zelf in voldoende mate te produceren, 1) terwijl de leukocyten van andere dieren zooals die van de kikvorsch, daartoe niet in staat zijn. Immers,

1) Wanneer we tenminste met avirulente stammen te doen hebben. Zijn de mikroben virulent, dan is ook het gesecerneerde opsonine en event. zelfs dat van normaalserum onvoldoende, en moeten we voor de opsonificatie tot immuunserum onzen toevlucht nemen.

wanneer men gewasschen kikvorschleukocyten met miltvuurbacillen in zoutsolutie samenbrengt, dan kan men wachten zoolang men wil, doch er komt geen noemenswaardige phagocytose tot stand. De zooeven geopperde onderstelling zullen wij straks en in het hoofdstuk over spontaanphagocytose nader theoretisch uitwerken.

Ik stelde mij in 1906 het opsonine voor als eene enkelvoudige stof met twee groepen in den zin van Ehrlich: een bakteriophiele groep, welke zich dank zij haar specifieke affiniteit op het mikroorganisme fixeert, en eene phagocytophile groep, die eerst na en dank zij de binding van de eerste groep in werking treedt — eene opvatting dus, overeenkomende met die van Hektoen en Ruediger (zie pag. 46), welke onderzoekers een haptophore en een opsoniphore groep in het opsonine aannamen, waarvan de laatste thermolabiel is.

Deze overwegingen brengen ons terug naar hoofdstuk III, waar wij tot de conclusie kwamen, dat de indentificatie van opsonine en amboceptor + complement zeker niet ongemotiveerd is. In hoeverre passen nu de feiten die wij bij het kikvorschserum vonden in deze theorie?

Indien de residuale phagocytose b.v. door verwarmd normaal menschserum berust op de aanwezigheid van den thermostabielen normalen amboceptor, dan zou daaruit volgen dat — aangezien geïnactiveerd kikvorschserum geen phagocytose van miltvuurbacillen door gewasschen kikvorschleukocyten tot stand doet komen — een anthraxamboceptor in normaal kikvorschserum ontbreekt. Laat ons zien of dit werkelijk zoo is.

Het had Malvoz (47) getroffen, dat het serum van den tegen miltvuur natuurlijk immunen hond absoluut geen bactericidie voor anthraxbacillen in vitro vertoont. Hij vond echter in het serum vrij veel normale milt-

vuuramboceptoren, en verklaarde zich de immuniteit van dit dier aldus: „ces fixateurs doivent favoriser énergiquement l'action des alexines contenues dans les leucocytes et qui sont autrement puissantes que celles qui s'échappent des globules blancs pendant la coagulation du sang *in vitro*.”

Ik heb nu, op het voetspoor van Malvoz en met behulp van de methode Bordet-Gengou, normaal kikvorschserum op zijn gehalte aan miltvuursensibilisatoren onderzocht, en wel — met de bijbehorende contrôleproeven op de volgende wijze:

- I. emulsie van miltvuurbacillen 2 druppels
- geïnactiveerd kikvorschserum 6 dr.
- versch konijnserum (als alexine) 1 dr.

Contact: 6 uur bij kamertemperatuur.

Daarna toevoegen: 12 druppels van eene 5 % emulsie van runder-erythrocyten, vooraf lege artis met haemolytischen amboceptor (konijn-rund) gesensibiliseerd.

Contact: 1 uur bij broedtemperatuur, en verder tot den volgende ochtend bij kamertemperatuur.

- II. als I, maar in plaats van inactief kikvorschserum: physiologische zoutsolutie.
- III. als II, maar in plaats van versch konijnserum: versch kikvorschserum.
- IV. als III, maar in plaats van miltvuuremulsie: zoutsolutie.

Resultaat: in IV is de haemolyse, zooals te verwachten was, compleet. In II is ze bijna compleet, wat erop wijst, dat konijnserum slechts zeer weinig miltvuurfixateurs bevat, en in elk geval minder dan kikvorschserum, want in I en III is de haemolyse, hoewel duidelijk, toch veel zwakker dan in II. Het blijkt nu ook, dat kikvorschserum weer minder fixateurs bevat dan hondserum, want Malvoz vond dat daar, bij gebruik

van dezelfde volumeverhoudingen in de proef en zelfs bij aanwezigheid van nog veel minder gesensibiliseerde roode bloedlichaampjes, de haemolyse totaal uitbleef.

Er zijn dus in kikvorschserum wel degelijk normale miltvuuramboceptoren aanwezig. Ook in geïnactiveerd serum zijn ze er, en blijven ze hun functie: fixatie op de mikrogenen en praepareeren van het terrein voor het complement, uitoefenen. Dit complement ontbreekt nu juist in het verwarmde serum, en hiermede gaat samen: uitblijven der phagocytose. Deze treedt eerst weder op na toevoeging van vers serum, d. w. z. van complement. Wij mogen dus gerust concludeeren dat de kikvorschleukocyten, onder de voorwaarden der proef, niet in staat zijn dat complement (in voldoende mate) te secerneeren.

Ik stel dus voorop — over het „waarom” behoef ik zeker niet nogmaals uit te wijden — dat de zwakke residuale phagocytose door verwarmd normaal serum in het algemeen berust op de aanwezigheid van normale amboceptoren, en de sterke phagocytose door geïnactiveerd immuunserum op de werking van de daarin quantitatief vermeerderde amboceptoren. Op grond van een en ander neem ik nu aan:

- 1°. dat daar, waar bij aanwezigheid van normale of immuunamboceptoren, phagocytose tot stand komt, de phagocyt voor de completeering van het opsonine (door complementproductie) zorgt.
- 2°. dat daar, waar bij afwezigheid van elk serumbestand-deel, phagocytose tot stand komt (spontaanphagocytose) en amboceptor en complement door de phagocyten worden geleverd.

Naar mijne meening is dus het opsonine eerst dan compleet, wanneer het, evenals het complete lysine, bestaat uit de combinatie amboceptor-complement.

Opsonine en lysine — wij identificeeren ze immers — ontvouwen eerst hunne werking wanneer ze compleet zijn. Phagocytose en lysis kunnen eerst dan tot stand komen, wanneer — bij aanwezigheid der beide componenten — deze elkanders functies aanvullen en mogelijk maken. Ik beschouw het opsonine, evenals Ehrlich het lysine, als eene gemakkelijk dissocieerbare verbinding — eene opvatting waartegen, naar ik meen, geen overwegende bezwaren zijn in te brengen. Het is daarom zeer wel mogelijk, dat ook in het boven sub 1°. bedoelde geval, *dus steeds*, het geheele „ambo-complement” door de leukocyten wordt geproduceerd, doch dat bij aanwezigheid van een bepaalde minimum-hoeveelheid op het antigeen *gefixeerden* amboceptor (waarvoor het complement steeds grootere affiniteit heeft dan voor *vrijen* amboceptor) deze — nl. de gefixeerde amboceptor — het complement tot zich trekt en aldus de dissociatie van het gesecerneerde „ambo-complement” tot stand brengt. Wij zullen op deze hypothese later nog meermalen terugkomen.

In den boven aangegeven zin nu kan mijne oorspronkelijke meening, evenals die van Hektoen en Ruediger over den bouw van het opsonine, in principe bewaard blijven, wanneer wij ons, in den zin van Ehrlich, slechts voorstellen, (zie fig. 3) dat twee haptophore groepen van amboceptor (a) en complement (b) in elkander grijpen, en dat hierdoor de beide componenten tot eene verbinding worden, welke los en gemakkelijk dissocieerbaar is zoolang het complex vrij in het milieu aanwezig blijft, doch die vast wordt zoodra de overgeblevenen thermostabiele haptophore en cytophiele resp. bakterio-

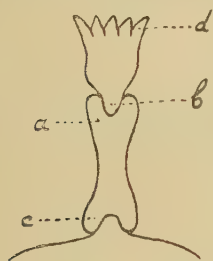


Fig. 3.

phiele groep (c) op het antigeen is gefixeerd. Dan treedt de thermolabiele opsoniphore groep van het complex (d) — in casu de fermentgroep van het complement — in werking. Deze zelfde groep kan ook, na inactivering als opsonoïd, de eenmaal door het ambo-complement bezette cel- resp. bacteriereceptoren bezet houden.

Laat ons thans zien, op welke experimenteele gronden nu vrijwel algemeen het complement als hoofdoorzaak, en zelfs als uitsluitende oorzaak wordt beschouwd van de opsonische werking van normaalserum.

Muir en Martin (48) konden door proeven met fixatie van het complement van normaalserum het volgende aantonen:

- a. gesensibiliseerde roode bloedlichaampjes nemen uit versch normaal serum niet alleen haemolytisch complement op, maar tegelijkertijd ook bactericide complement en opsonine.
- b. versch normaal serum, met een serumpraecipitaat behandeld, verliest ongeveer in gelijke mate zijn haemolytisch-completeerend, bactericide en opsonisch vermogen.
- c. gesensibiliseerde bakteriën absorbeeren uit versch normaal serum gelijkelijk bactericide en haemolytisch complement en opsonine.

Neufeld en Hüne (21) vonden:

- a. Fixatie van het complement van normaalserum op gistcellen doet daarmede tegelijkertijd het opsonisch vermogen van dit serum verloren gaan.
- b. Bij samenvoeging van een praecipitinogeen serum met zijn antiserum in een versch normaalserum, ziet men met de deviatie van het complement door het praecipitaat tevens het opsonine verdwijnen (c.f. ook Muir en Martin sub b).

Ook Levaditi met Inmann en Koessler vonden (39-43), dat complement- en opsoninewerking gelijkelijk verloren gaan door fixatie van het eerste op mikrobe- en op orgaancellen-emulsies. Ook heeft een anticomplementair serum tevens alle eigenschappen van een antiopsonisch serum. Voorts bleek nog dat de opsonische werking van den zoogenaamden „secundairen” humor aquaeus 1) en van oedeemvocht afhankelijk is van hun gehalte aan bakteriolytisch complement.

Dean heeft zijne reeds vroeger door mij gerefereerde opvattingen omtrent den complexen bouw van het opsonine nog nader aan het experiment getoetst (49). Ook hij vond, evenals de reeds genoemde onderzoekers, de gelijktijdige deviatie van complement en opsonine door praecipiteerende sera. Bovendien bleek hem nog dat twee normaalsera (van konijn en cavia), die in een bepaalde combinatie — 't eerste geïnactiveerd, 't laatste versch — het sterkste bakteriolytische effect hadden op typhusbacillen, ook in diezelfde combinatie de krachtigste opsonische werking op deze mikrobe vertoonden.

Vermelden we ten slotte, dat Noguchi (50) het opsonisch vermogen behouden vond in een serum dat sedert twee jaren droog was bewaard, en dat hij dit ingedroogde serum tot boven 100° kon verhitten, zonder de opsonische kracht ervan te vernietigen. Ook hier dus een volkomen paralellisme met de complementaire serumeigenschap, welke ook aan hooge temperaturen

1) De humor aquaeus dien men verkrijgt, wanneer men voor de eerste maal een konijnen oog puncteert, bevat geen (of hoogstens sporen) complement. Het stolt niet en bevat geen vormelementen, en het blijkt evenmin opsonisch te werken. Twee tot drie uren na eene eerste punctie heeft zich nieuw kamervocht gevormd („humeur aqueuse de seconde formation”, zooals de Fransen het noemen), dat wel stolbaar is. Het bevat meestal complement (Sweet, Römer, Wessely, Schneider), doch soms ook niet (Levaditi); de oorzaak dezer wisselvalligheid is onbekend.

weerstand biedt, wanneer het serum in drogen toestand verkeert.

Nog vóórdat de resultaten der zooeven genoemde onderzoeken alle bekend waren, heb ik getracht, de beteekenis van het complement als opsonische factor in normaalsera door een aantal experimenten duidelijk te maken. 1) Ik heb daarbij de techniek der complement-fixatie toegepast, en gebruik gemaakt van de vroeger door mij aangetoonde eigenschap van kikvorschleukocyten, namelijk dat zij de eigenschap om miltvuurbacillen in zich op te kunnen nemen, na herhaalde wassching met zoutsolutie volkomen verloren hebben, en dat versch serum ze weder activeert door fixatie van het serumopsonine op de bakteriën. Voorts had ik mij vooraf ervan overtuigd, dat versch kikvorschserum complete haemolyse veroorzaakt bij rundererythrocyten die met geïnactiveerd specifiek serum (konijn-rund) zijn voorbehandeld. Indien het miltvuur-opsonine van het kikvorschserum met het complement identisch ware, dan mocht het laatste, nadat we het vooraf op bakteriën gefixeerd hadden, niet meer in staat zijn gesensibiliseerde roode bloedlichaampjes te haemolyseeren. Ik heb, om dit te onderzoeken, het volgende experiment met de bijbehorende contrôleproeven verricht.

- A. In elk van 6 zeer kleine buisjes wordt een druppel eener dikke emulsie van miltvuurbacillen gebracht (24 uur oude agarcultuur). Hieraan wordt toegevoegd resp. $\frac{1}{20}$, $\frac{1}{40}$, $\frac{1}{80}$, $\frac{1}{160}$, $\frac{1}{320}$, $\frac{1}{640}$ cM³. versch kikvorschserum. Men mengt goed, laat beide $\frac{1}{2}$ uur in contact, en centrifugeert dan.
- B. Van het bovendrijvende vocht in de gecentrifugeerde buisjes A worden gelijke hoeveelheden (telkens een

1) De publicatie verschijnt binnenkort in het Centralblatt für Bakteriologie, en het onderzoek werd verricht in het Institut Pasteur te Brussel.

druppel) gebracht in 6 andere buisjes, die elk bevatten 0.5 cM³. eener 5 %-emulsie van met haemolytischen sensibilisator beladen runder-roode-bloed-lichaampjes.

- C. Van de bij A genoemde en daarna gewasschen bacillen worden gelijke volumina samengebracht met eveneens gelijke volumina eener suspensie van driemaal gewasschen kikvorschleukocyten.

Men vergelijkt nu de intensiteit der event. dadelijk optredende phagocytose in C met den graad der haemolyse die zich na eenigen tijd in de buisjes B vertoont.

- D. Ter contrôle neemt men nog 6 buisjes, elk met 0.5 cM³. van dezelfde gesensibiliseerde erythrocyten-emulsie als in B, en voegt aan elk een druppel van gelijke volumina van $\frac{1}{20}$, $\frac{1}{40}$, $\frac{1}{80}$, $\frac{1}{160}$, $\frac{1}{320}$, en $\frac{1}{640}$ cM³. versch kikvorschserum toe, dat niet vooraf met miltvuurbacillen was behandeld.

Het resultaat van dit experiment is het volgende:

- 1°. In C neemt de intensiteit der phagocytose af van buisje I tot VI. In I is de phagocytose zeer duidelijk, in VI is daarvan niets meer waar te nemen. Dit is zeer begrijpelijk; immers, de bacillen hebben bij de steeds sterkere serumverduunning in A steeds minder opsonine kunnen binden.
- 2°. In B treedt in geen enkel der 6 buisjes haemolyse op. Dit zou zijn oorzaak daarin kunnen vinden, dat de verdunningen van het serum in A te sterk waren genomen, om eene appreciable alexinewerking aan den dag te kunnen brengen. Dit is echter niet zoo, want:
- 3°. In D vertoont zich in de vier eerste buisjes nog afnemende haemolyse, terwijl deze in de twee laatste buisjes uitblijft. (Hier was de serumverduunning dus werkelijk te sterk).

Deze proef leert ons dus:

- a. dat met het opsonine tegelijkertijd ook het complement gefixeerd wordt.
- b. dat de intensiteit van de werking van opsonine en complement bij voortgezette serumverduunningen in gelijke mate afneemt.

Het parallellisme tusschen opsonine- en alexinewerking is dus treffend.

Nu heb ik ook het omgekeerde experiment verricht om mij te overtuigen of een normaalserum, dat vooraf in behoorlijke quantiteiten met gesensibiliseerde roode bloedlichaampjes ter completeering van deze is samengebracht, met het alexine ook zijne opsonine verloren heeft. Het zou nu intusschen mogelijk kunnen zijn, dat de, na toevoeging van versch complementhoudend serum aan gesensibiliseerde erythrocyten optredende haemolyse, de opsonische werking zou belemmeren en aldus de latere phagocytoseproef met dit serum onzuiver zou maken. Deze overweging was voor mij aanleiding versch paardserum te gebruiken, welks alexine — zooals men weet — zich zeer goed aan gesensibiliseerde bloedlichaampjes bindt, doch geen haemolyse veroorzaakt. Ook had ik vooraf waargenomen, dat versch paardserum een krachtig opsonisch effect te weeg brengt, wanneer het met miltvuurbacillen en gewassen kikvorschleukocyten wordt samengebracht. De techniek van het geheele experiment bestaat in 't volgende:

Buisje A bevat:

2 cM³. eener driemaal gewassen 5 %-emulsie van rundererythrocyten, benevens 0.2 cM³. inactief specifiek-haemolytisch serum (konijn-rund).

Buisje B bevat:

dezelfde hoeveelheid bloed als A, benevens 0.2 cM³. physiol. zoutsolutie.

Men mengt goed, waarna de buisjes een kwartier aan zichzelf worden overgelaten. Dan worden ze met zoutoplossing verder gevuld, geschud, gecentrifugeerd en al het bovendrijvende vocht zorgvuldig verwijderd. Men voegt dan aan het centrifugaat in elk der beide buisjes toe: 0.2 cM^3 . physiol. zoutoplossing benevens 0.1 cM^3 . versch paardserum, men schudt en laat de mengsels gedurende twee uur in contact. Dan wordt gecentrifugeerd, en de vloeistof voor het vervolg van de proef gebruikt.

Het is duidelijk dat, wanneer men de quantitative verhoudingen goed heeft gekozen (en dit is hier het geval), in buisje A $\pm$ al het complement van het paardserum door de gesensibiliseerde roode bloedlichaampjes is gebonden, terwijl het in buisje B nog vrij in het medium aanwezig is. Ter toetsing van deze, overigens alleszins gerechtvaardigde onderstelling, kunnen wij ons van een verschijnsel bedienen, dat tusschen Ehrlich en Sachs (51), later ook Sachs en Bauer (52) eenerzijds, Bordet en Gay (53) anderzijds aanleiding heeft gegeven tot discussie over de verklaring van het verschijnsel der complement-deviatie. Wij willen hier op dezen theoretischen strijd niet ingaan, doch slechts het feit vermelden dat het bijeenvoegen van verdund gewassen caviabloed met geïnactiveerd runderserum en versch paardserum in de juiste quantiteiten tot een snelle en krachtige agglutinatie (gevolgd door haemolyse) aanleiding geeft, voor welk verschijnsel het alexine van het paardserum noodig is.

Wij nemen nu twee nieuwe buisjes, *a* en *b*, die beide 0.2 cM^3 . physiol. zoutsolutie, 1 druppel verdund (1 : 10) en gewassen caviabloed, benevens $\frac{1}{2}$ druppel geïnactiveerd runderserum bevatten. Aan het mengsel *a* wordt een druppel vloeistof uit buisje A, aan hetzelfde mengsel

b een druppel vocht uit buisje B toegevoegd. Terwijl nu in het mengsel *b* na ongeveer 10 minuten de bloedlichaampjes duidelijk geagglutineerd zijn, is de agglutinatie in *a* nog volkomen afwezig en blijft ook verder uit. Het vocht B bevat dus vrij complement, A echter niet meer.

Laat ons nu zien, hoe het met de opsonische kracht dezer beide vchten is gesteld. Daartoe worden de in de hier volgende tabel aangegeven mengsels bereid, met gelijke hoeveelheden van de verschillende componenten en volgens de vroeger door mij beschreven techniek. De tellingen verricht aan de uitstrijkpraeparaten van een mijner proeven gaven het volgende resultaat:

I.	gewassen kikkorschleukocyten	}	geen phagocytose.
	emulsie van miltvuurbacillen . .		
	physiologische NaCl oplossing .		
II.	kikkorschleukocyten	}	28 % der getelde leukocyten zijn in phagocytair verband met miltvuurbacillen.
	miltvuurbacillen . .		
	vocht uit buisje A		
III.	leukocyten . .	}	78 % der leukocyten hebben gephagocyteerd.
	miltvuur . .		
	vocht uit buisje B		
IV.	leukocyten	}	minimale phagocytose.
	emulsie van typhusbacillen . .		
	physiol. zoutoplossing		
V.	leukocyten	}	19 % der getelde leukocyten zijn meer of minder met typhusbacillen gevuld.
	typhusbacillen		
	vocht A		
VI.	leukocyten	}	83 % der leukocyten hebben gephagocyteerd.
	typhusbacillen		
	vocht B		

Dit experiment leert ons dus, dat met het alexine ook het opsonine voor verreweg het grootste gedeelte uit een serum verdwijnt.

Wij willen nu in dit verband nog een laatste complementbindingsproef aanvoeren tot steun van de opvatting van het parallellisme tusschen alexine- en opsoninewerking. Ik ging daarbij uit van het volgende feit: konijnbloed ondergaat onder den invloed van versch hondserum sterke haemolyse; in de juiste hoeveelheden bij elkaar gebracht trekken de konijnerythrocyten alle normale haemolytische amboceptoren en al het complement van het hondserum tot zich. Van dit verschijnsel nu wordt in de hier te beschrijven proef op de volgende wijze gebruik gemaakt:

Buisje I: 0.2 cM^3 normaal gedefibrineerd konijnbloed wordt driemaal met zoutsolutie gewasschen; na de derde wassching wordt al het vocht zorgvuldig verwijderd. Aan het erythrocytencentrifugaat wordt 0.2 cM^3 versch hondserum toegevoegd, en 2 druppels zoutoplossing. Men mengt goed. Contact 2 uur.

Buisje II: 0.2 cM^3 eener dikke emulsie van miltvuurbacillen (agarcultuur van 24 uur) wordt vermengd met 0.2 cM^3 versch hondserum en 2 druppels zoutsolutie. Contact 2 uur.

Na twee uur worden beide buisjes gecentrifugeerd; in I is sterke haemolyse opgetreden. Ter onderzoek van het vocht van buisje II op zijn complementgehalte bereiden wij nu in drie nieuwe buisjes de volgende mengsels:

- A. 0.5 cM^3 gewasschen konijnbloed.
1 druppel versch hondserum.
- B. 0.5 cM^3 gewasschen konijnbloed.
1 druppel vocht uit buisje II.
- C. 0.5 cM^3 gewasschen konijnbloed.
1 druppel zoutsolutie.

Contact 2 uur. Resultaat:

- A. Haemolyse.

B. Zwakke haemolyse, duidelijk zwakker dan in A.

C. Geen haemolyse.

De haemolyse in A is natuurlijk zwakker dan in buisje I, omdat in dit laatste gelijke deelen bloed en serum bijeen zijn gevoegd, en de verdunning van het serum in A veel sterker is. De hoofdzaak is echter, dat de zwakkere haemolyse in B nogmaals bewijst, dat in buisje II binding van het complement aan de bacteriën heeft plaats gevonden. Met het vocht uit buisje I kan deze contrôleproef natuurlijk niet worden verricht, aangezien hier reeds haemoglobine in oplossing is.

Nu worden ten slotte nog de volgende opsonineproeven uitgevoerd:

- | | | |
|--|---|-----------------------------|
| 1. gewassen hondleukocyten | } | zeer sterke
phagocytose. |
| miltvuurbacillen | | |
| versch hondserum | | |
| 2. leukocyten } als in 1. | } | zwakke
phagocytose. |
| miltvuur | | |
| vocht uit buisje I | | |
| 3. leukocyten } als in 1 en 2. | } | zwakke
phagocytose. |
| miltvuur | | |
| vocht uit buisje II | | |
| 4. leukocyten als in 1, 2 en 3 | } | zeer sterke
phagocytose. |
| bacillen uit buisje II, met zoutsolutie | | |
| gewassen | | |
| geen serum, alleen wat zoutsolutie | | |

Het opsonine is dus voor 't grootste gedeelte, tegelijk met het alexine uit het hondserum verdwenen (2 en 3); het heeft zich in buisje I op de roode bloedlichaampjes (haemolyse) en in buisje II op de bacteriën gefixeerd. (4)

Al het bovenstaande geeft ons de overtuiging, dat bij het normaalserum het parallellisme tusschen com-

plement- en opsoninewerking zóó ver gaat, dat beide niet meer als elk op zichzelf staande beschouwd kunnen worden, doch dat wij ze moeten identificeeren. Deze conclusie is zeer goed in overeenstemming met het steeds weer geconstateerde feit — ook door mij voor kikkorschserum aangetoond — dat het normale opsonine in hoofdzaak thermolabiel is.

Het verschil tusschen opsonine en agglutinine in kikkorschserum ten opzichte van miltvuurbacillen heb ik eveneens reeds aangetoond door middel van de verschillende temperaturen waarbij ze vernietigd worden (opsonine bij 56°, agglutinine bij 70°). Een ander bewijs vinden we nog in de proeven V en VI op pag. 96; hier zijn de verschillen in de intensiteit der phagocytose bijzonder groot, terwijl toch de extracellulaire typhusbacillen in de praeparaten van beide proeven door het paardserum even sterk geagglutineerd zijn.

Wij hebben nu gezien, dat met het alexine tegelijk ook het opsonine door middel van sensibilisatoren gefixeerd of door verwarming vernietigd wordt. Er blijft echter ook in de normale sera na fixatie of vernietiging van het opsonine (alexine) nog bijna steeds eenige opsonische werking over (zie o.a. de proeven II en V op pag. 96), een verschijnsel waarop, zooals we weten, door Dean 't eerst is gewezen. Aangezien wij nu tot op dit oogenblik nog geenerlei aanleiding vinden om aan te nemen, dat in normale sera het complement zich zonder bemiddeling van een amboceptor op mikroben zou fixeeren, hebben wij naar mijne meening *de opsonische werking van normale sera principieel als eene gecombineerde amboceptor-complement-werking op te vatten*, waarvan aan het complement de voornaamste functie toekomt, doch voor 't uitoefenen waarvan voorafgaande fixatie door middel van amboceptoren noodzakelijk is.

De beteekenis van den amboceptor ook voor de opsonische werking van normaal serum wordt meer en meer erkend. Zoo toonde Ledingham (54) in normaal menschserum de aanwezigheid aan van een opsonischen amboceptor voor tuberkelbacillen. Hij gebruikte daarvoor de reactie van Bordet-Gengou, doch verving daarin de haemolytische contrôle door een opsonisch-phagocytair contrôle-mengsel. Overigens erkent ook Levaditi de complexe constitutie van normaal opsonine (39).

Ik heb nu getracht, eveneens met behulp van de Bordet-Gengou'sche methode en op de wijze zooals ik dat op pag. 87 voor kikvorschserum heb aangegeven, om voor een aantal sera hun relatief gehalte aan normale miltvuuramboceptoren te bepalen. Het resultaat volgt hieronder. Ik heb de mengsels gerangschikt volgens de toenemende haemolyse, d.w.z. volgens de afnemende hoeveelheid normale amboceptoren in de betreffende sera.

I. emulsie van miltvuurbacillen 2 druppels

geïnactiveerd *mensch*serum 6 dr.

versch konijnserum (als alexine) 1 dr.

Contact: 6 uur bij kamertemperatuur.

Daarna toevoegen: 12 druppels van eene 5% emulsie van rundererythrocyten, die vooraf lege artis met haemolytischen amboceptor (konijn-rund) zijn gesensibiliseerd.

Contact: 1 uur bij broedtemperatuur, en verder tot den volgenden ochtend bij kamertemperatuur.

II. als I, maar in plaats van geïnactiveerd menschserum: inactief *rund*serum.

III. als II, maar i. p. v. rundserum: *hond*serum.

IV. als III, maar i. p. v. hondserum: *kikvorsch*serum.

V. als IV, maar i. p. v. kikvorschserum: *paard*serum.

VI. als V, maar i. p. v. paardserum: *konijn*serum.

Wij kunnen hier al dadelijk de opmerking niet weerhouden, dat de hoeveelheid amboceptor in een nor-

maalserum, evenmin als de phagocytose als zoodanig van avirulente stammen in vitro, een maat is voor de natuurlijke resistentie van een dier tegen miltvuur. Het beslissende moment ligt *in* de leukocyten, eene opvatting die door Metchnikoff steeds is verdedigd, en die in den laatsten tijd steeds meer bevestigd wordt, niet 't minst ook door de onderzoekingen van Pettersson over bactericide leukocytenstoffen (55). Ook Ottolenghi (56) signaleerde de aanwezigheid van miltvuur-amboceptoren in de niet-bactericide sera van rund, hond en schaap.

Laat ons nu zien, hoe het gesteld is met de phagocytose van miltvuurbacillen door de leukocyten resp. van de cavia en van het konijn onder den invloed van hun eigen serum en onder dien van de zooeven onderzochte normale sera (zie de tabel op pag. 102).

Wat leert ons deze tabel? In de eerste plaats, dat, ook wanneer er eene zeer krachtige spontaanphagocytose optreedt, deze nog toeneemt en maximaal is in een milieu van versch serum van het eigen dier (of van een individu van dezelfde diersoort). Inactief homolog serum doet ook de phagocytose nog toenemen, doch in mindere mate dan versch serum. Met uitzondering nu van menschserum bij cavialeukocyten hebben alle andere geïnactiveerde heterologe sera een zwakkere werking dan het eigen inactief serum. Meestal zelfs is de phagocytose onder den invloed van heteroloog serum zwakker dan de spontaanphagocytose, d. w. z. dat het vreemde serum blijkbaar de leukocyten in hunne functiën belemmert. En van eenig paralellisme tusschen het gehalte aan normale miltvuuramboceptoren van een serum en de intensiteit der phagocytose onder den invloed van dat serum is in casu niets te bemerken. De sera van hond en rund b.v., die meer miltvuuramboceptoren bevatten dan konijnserum, doen de

	Zonder serum	Eigen versch serum	Eigen inactief serum	Ver- warmd mensch- serum	Ver- warmd rond- serum	Ver- warmd hond- serum	Verwarmd kikvorsch- serum.	Ver- warmd paard- serum	Ver- warmd konijn- serum
Cavia-phagocyten	91 %	97.5 %	92 %	100 %	85 %	80 %	88.75 %	87.5 %	90 %
Konijn-phagocyten.	66 %	92.5 %	78.75 %	68.75 %	47.5 %	57.5 %	33.75 %	75 %	78.75 %

Voor elke combinatie is aangegeven het percentage der getelde leukocyten, dat in phagocytair verband was getreden met miltvuurbacillen.

Alle proeven werden nauwkeurig onder dezelfde uitwendige voorwaarden verricht.

spontaanphagocytose van miltvuurbacillen door konijn-leukocyten dalen van 66 % resp. tot 57.5 % en 47.5 %.

De verklaring hiervan ligt voor de hand. Een heteroloog serum is voor de betreffende leukocyten geen fysiologisch milieu; er zijn hier nog andere invloeden in 't spel dan alleen de fysisch-chemische eener isotonische keukenzoutoplossing. Soms zelfs werkt zulk een serum beslist toxisch; zoo wordt b.v. alle phagocytose door menscheukocyten bij aanwezigheid van kikvorserserum totaal onderdrukt, en hiervan zouden meer voorbeelden te geven zijn. Aan deze cardinale quaestie wordt echter, ook in de opsoninen-litteratuur, ternauwernood de aandacht geschonken. Men werpt de meest verschillende leukocyten met de meest uiteenloopende sera stelselloos dooreen, en verkrijgt dan natuurlijk vaak de meest verwarrende resultaten. Slechts streng stelselmatig onderzoek kan hier op den duur betrouwbare gegevens opleveren.

Wij dienen deze feiten ook wel ter dege in 't oog te houden, wanneer wij het een of ander antiserum dat ons in het dierexperiment goede resultaten heeft gegeven, prophylactisch of therapeutisch bij den mensch willen toepassen. Immers, indien het eventueele leukotoxische effect ervan de opsonische werking overtreft, dan kunnen wij daarmee slechts schaden. Natuurlijk bestaat hiervoor bij immuunsera met hun hoog amboceptorengehalte in het algemeen minder gevaar. Toch blijft het steeds een gebiedende eisch, dat wij ons door phagocytoseproeven in vitro van menscheukocyten onder den invloed van het betreffende serum vooraf van de te verwachten waarde ervan *voor den mensch* trachten te overtuigen. Daarbij komen nog de gevaren van de reinjectie of anaphylaxie. Waar mogelijk blijft actieve immuniseering dan ook steeds te verkiezen.

Doch wij dwalen af. De verklaring van het opsonisch vermogen van normaalserum als gecombineerde amboceptor-complement-werking schijnt mij op voldoende vaste experimenteele gronden te berusten, en dus aannemelijk te zijn. In het volgende hoofdstuk willen wij den bouw der immuunopsoninen aan een nadere beschouwing onderwerpen, en zulks voor een goed deel aan de hand van opsonisch-haemolytische sera, die immers ook voor de studie van den bouw en de eigenschappen van het lysine in het algemeen steeds zulke uiterst bruikbare objecten zijn geweest. Wij zullen daarbij tevens de gelegenheid hebben om aan een aantal klinisch-opsonische bepalingen verderen steun te ontleenen voor onze theoretische opvattingen omtrent de constitutie en het niet-bestaan eener autonomie ook der immuunopsoninen.

HOOFDSTUK VI.

OVER IMMUUNSERUM ALS MILIEU EN OVER DEN BOUW VAN HET IMMUUNOPSONINE.

De constitutie van het normaalopsonine vastgesteld zijnde, rest ons nu de vraag te beantwoorden: hoe staat het met den bouw der opsoninen van immuunsera?

Het stond sedert langen tijd vast, dat bij infectie van geïmmuniseerde dieren met het betreffende anti-geen de intensiteit van de phagocytose belangrijk is toegenomen. Hetzelfde geldt voor normale dieren bij welke men tegelijk met het infecteerende agens het daarbij behorende immuunserum inbrengt. Waar het nu gebleken was dat het verhoogde cytolytisch vermogen van immuunserum berust op de quantitatieve toename van amboceptoren en op de aanwezigheid van complement, daar deed zich reeds vóór de opsonische periode de vraag voor: berusten deze beide eigenschappen der immuunsera, nl. om phagocytose en cytolyse te doen toenemen, beide op denzelfden serum-component, dan wel, hebben we hier met twee verschillende stoffelijke oorzaken te doen?

Men weet dat Metchnikoff het bestaan der stimulinen supposeert, stoffen die de leukocyten tot verhoogde activiteit zouden prikkelen. Nu echter is aangetoond,

dat zoowel normaal- als immuunopsonine zich op de mikrogen fixceert, verliest deze onderstelling veel van hare waarschijnlijkheid. Intusschen sluit Metchnikoff, hoewel persisterende bij zijne stimulinentheorie, daarnaast eene andere opvatting geenins uit. Deze nu, door Savtchenko in 1902 geïnaugureerd, komt hierop neer, dat de krachtige phagocytose zoowel van mikrogen als van roode bloedlichaampjes onder den invloed hunner respectieve immuunsera berust op de fixatie van de amboceptoren op het antigeen. Bedoeld onderzoek van Savtchenko (57) en de daaraan vastgeknoopte beschouwingen zijn voor ons onderwerp van zóó fundamentele beteekenis, dat wij eenigzins nader daarop moeten ingaan.

Savtchenko begint met erop te wijzen, dat b.v. miltvuurbacillen en streptococcen van zekere virulentie, in de buikholte van een daarvoor gevoelig dier gebracht, al spoedig eene generatie doen optreden, die zich met een kapsel omgeeft en niet meer door phagocyten wordt opgenomen, d. w. z. op deze een negatief chemotactischen invloed uitoefent 1) (c. f. Bordet pag. 66 en Stiennon pag. 67). Hij verklaart dit verschijnsel met behulp van de onderstelling „que le microbe, en outre des substances qu'il possède à l'état saprophyte, a acquis dans l'intérieur de l'organisme quelque chose de plus, qui provoque la chimiotaxie négative du leucocyte," 2) of wel dat we te doen hebben met „un état

1) Preisz (58) heeft deze kapselsubstantie langs chemischen weg trachten te isoleeren, hij vond, dat de aldus door hem verkregen stof de werking van miltvuursera neutraliseert.

2) Het begrip „negatieve chemotaxis", dat intusschen in dit verband zeer juist is toegepast, verdient echter in het algemeen scherper omschreven te worden. Het gaat toch niet aan, zooals Savtchenko in ditzelfde artikel doet, het onder normale omstandigheden niet gephaagocyteerd worden van roode bloedlichaampjes door hun eigen leukocyten als negatieve chemo-

physique spécial de la surface du microbe, état qui le rend inaccessible au phagocyte." En ziehier nu zijne opvatting omtrent de beteekenis der specifieke sera: „l'action des sérums peut être expliquée par la suppression de la propriété nouvelle du microbe," en „l'action du sérum transforme alors le microbe pathogène en saprophyte facilement phagocyté par les leucocytes." Deze geheele redeneering nu is wederom zeer actueel geworden, en dit wijst wel op de juistheid ervan. Zij sluit namelijk reeds de grondidee van Bail's aggressinenleer in zich. Het zijn immers de aggressinen (wij laten in 't midden of we hier met nieuwe specifieke stoffen te doen hebben) die de leukocyten verre houden, de virulentie der mikroben bepalen en aan deze de gelegenheid geven zich onbeperkt te vermeerderen. Waar nu blijkt dat het immuunserum de werking dezer stoffen neutraliseert en aan de leukocyten gelegenheid geeft om tot phagocytose over te gaan, daar kunnen wij Savtchenko's opvatting gemoderniseerd in deze woorden uitdrukken: opsoninen zijn antiaggressinen. Ook Pettersson sprak reeds dit vermoeden uit (55).

Savtchenko bestudeerde nu de phagocytose van roode bloedlichaampjes onder den invloed van geïnactiveerde specifieke haemolytische sera. Hij bediende zich van erythrocyten, omdat dit onderzoeksobjecten zijn met constante eigenschappen, en omdat hij reeds inzag dat men bij het werken met mikroben, ten gevolge van variaties in de virulentie van deze, niet of grofweg

taxi te qualificeeren. Ik zou hier liever den term „indifferentie" willen gebruiken; doch ook dit woord dient niet misbruikt te worden. Phagocytose van indifferente stoffen, ook wel „toevallige" phagocytose genoemd, bestaat niet: het verschijnsel der phagocytose zelve als biologische reactie toont zulks aan. De gefagocyteerde lichaampjes, welke deze dan ook mogen zijn, hebben blijkbaar op de leukocyten een prikkel uitgeoefend, die deze tot activiteit noopte.

gemeten, gevaar loopt onjuiste algemeene conclusies te trekken — eene waarheid die, vooral dank zij de opsoninenonderzoekingen steeds duidelijker aan het licht treedt. Savtchenko komt nu tot het besluit, dat de phagocyttaire reactie wordt veroorzaakt door directe werking van den fixateur op bloedcel of bacterie. Evenwel, het stimulinebegrip laat hij niet los; hij stelt de affiniteiten der fixateurs tot hun specifiek object en tot den phagocyt op één lijn: het zijn ware „intermédiaires.” („Zwischenkörper” van Ehrlich). Hij vond namelijk, dat ook leukocyten fixateur kunnen absorbeeren die na eenmaal wasschen niet verdwijnt, en dat deze dan ook niet-gesensibiliseerde roode bloedlichaampjes opnemen. Tegen deze laatste proeven is echter het volgende in te brengen. In de eerste plaats is het karakter van de binding van den fixateur aan bacterie en aan leukocyt geheel verschillend. Het is zelfs de vraag of we in het laatste geval wel van eene binding mogen spreken. Immers, wascht men de met immuunserum behandelde leukocyten een paar maal (meer dan éénmaal!), dan is de toename in phagocytair vermogen welke zij juist aan deze voorbehandeling dankten, vrijwel steeds verdwenen. Daarentegen kan men mikrogen, die een voldoende hoeveelheid specifieke fixateurs op zich gefixeerd hebben, wasschen zoo vaak men wil, zij blijven hun eenmaal gesensibiliseerd (geopsoniseerd) karakter behouden, hetwelk zich juist uit in hun grootere phagocytteerbaarheid. Wij mogen dan ook aannemen, dat na ééne wassching van de voorbehandelde leukocyten de daaraan nog klevende fixateurs bij de daarop volgende phagocytoseproef in het milieu diffundeeren, zich op de mikrogen fixeeren en aldus hunne functie uitoefenen.

Overigens dient er met nadruk op gewezen dat, ook al bezigt Savtchenko den *naam* stimulinen, toch het

begrip dat hij er aan hecht zich niet volkomen dekt met de oorspronkelijke Metchnikoffsche opvatting. Immers, Savtchenko vereenigt èn de sensibiliseerende èn de stimuleerende werking der immuunsera in één soort antistoffen: de fixateurs, of beter gezegd, hij voegt aan de stimuleerende werking der specifieke sera de sensibiliseerende toe (van de laatste was tot op dat oogenblik bij Metchnikoff geen sprake), en hij localiseert beide functies in de thermostabiele fixateurs. Had Savtchenko slechts meer den nadruk gelegd op het *primaire* karakter van de sensibiliseerende, en op het *secondaire* van de stimuleerende werking — zijne opvatting zou, voor zoover zij geldt het thermostabiele deel van het opsonine, in alle opzichten juist zijn geweest.

Ook van de phagocytose onder den invloed van normaalserum, bij afwezigheid van lytische werking van het laatste, heeft Savtchenko eene hypothese gegeven, waarvan wij nu, dank zij het moderne opsoninenonderzoek erkennen, dat zij voor een goed deel met de feiten strookt. Hij schrijft: „Il est possible qu'il existe dans le plasma un minimum de fixateur insuffisant pour être décelé par la réaction de dissolution, mais tout à fait suffisant pour provoquer la phagocytose après s'être fixé sur ces derniers (c.à.d. les globules).”

Intusschen, één schakel in het proces heeft Savtchenko over 't hoofd gezien, n.l. het complement. Dit ware hem zeker niet ontgaan, indien hij niet alleen met geïnactiveerde sera had gewerkt, doch deze ook in verschen toestand of gecomplementeerd ter vergelijking had toegepast. Ook is 't hem ontgaan dat hij, door het gebruik van niet- of onvoldoende gewasschen exsudaatleukocyten, steeds actief complement in zijne proeven invoerde.

Hoe kunnen wij nu ook hierbij de beteekenis van

het complement experimenteel bepalen? Bij vergelijking van de werking van verse en van geïnactiveerde haemolytische sera op de phagocytose stuiten we op de moeilijkheid, dat in het eerste geval de reeds extracellulair optredende haemolyse het beeld minder scherp maakt, en misschien den loop van het proces zou kunnen beïnvloeden. Zoo bestudeerde ik o. a. de phagocytose van gesensibiliseerde rundererythrocyten door gewassen kipleukocyten bij aanwezigheid van versch kipserum, en ik kon daarbij in vele leukocyten schimmen van roode bloedlichaampjes waarnemen, die met eosine niet of nauwelijks meer kleurbaar waren. Hieruit blijkt in elk geval, dat de haemoglobine met de opsonische serumwerking niets heeft uit te staan, en ik kan er bijvoegen dat de haemolyse hier reeds extracellulair, vóór de opname in de leukocyten had plaats gevonden, en wel omdat in de phagocyten absoluut geen vrij haemoglobine aanwezig was, terwijl juist bij intracellulaire digestie van intact opgenomen roode bloedlichaampjes de leukocyten de bloedkleurstof vrij langen tijd in den vorm van grootere en kleinere eosinophile bolletjes en korreltjes in zich plagen mee te dragen. 1)

Om nu deze extracellulaire haemolyse bij proeven met gecompleteerd serum te ontgaan heb ik mij ook hier van versch paardserum bediend, welks alexine zich immers wel op gesensibiliseerde cellen fixeert doch niet tot lysis aanleiding geeft, en daarentegen weer wel opsonisch werkt (zie ook hoofdstuk V). Bij proeven

1) In dit verband zij er aan herinnerd, dat niet alleen de intracellulaire resten van gefagocyteerde roode bloedlichaampjes, maar dat ook opgenomen mikroben (o. a. miltvuurbacillen, streptococcen) in een zeker stadium van digestie eosinophilie beginnen te vertoonen (Mesnil, Bordet). Met 't oog hierop beschouwen Metchnikoff e.a. de eosinophile korrels van polynucleaire leukocyten als digestieproducten van vroeger opgenomen cellig materiaal.

met een makrophagenexsudaat van het konijn was het mij reeds opgevallen, dat gewasschen leukocyten de gesensibiliseerde en tevens gealexineerde roode bloedlichaampjes bijzonder krachtig opnamen, maar dat de alleen van specifiek-haemolytischen sensibilisator doch niet van versch complement voorziene erythrocyten ook wel, doch in mindere mate dan de eerste het slachtoffer werden der leukocyten; gewasschen, niet voorbehandelde bloedlichaampjes werden niet gefagocyteerd. Ik heb het verschijnsel daarna ook nog bij leukocyten van den hond bestudeerd, waarmede, nadat ze driemaal waren gewasschen, de volgende mengsels werden bereid:

- | | |
|---|---|
| I. leukocyten | } |
| 3 × gewasschen rundererythrocyten | } |
| II. leukocyten | } |
| gesensibiliseerde roode bloedlichaampjes | } |
| III. leukocyten | } |
| vooraf gesensibiliseerde, daarna gealexineerde bloedlichaampjes | } |
| IV. leukocyten | } |
| roode bloedlichaampjes + alexine (d. w. z. met versch paardserum als milieu). | } |

Contact: 1 uur bij 37° 1). Het bloed van de mengsels II en III wordt na elke voorbehandeling weder met zoutsolutie gewasschen. Hierdoor komen in de proef alleen die serumbestanddeelen in actie, welke door de roode bloedlichaampjes zijn gebonden; al 't overige wordt door de wassching verwijderd. Het resultaat is, dat in I en IV de phagocytose uitblijft; in II is ze reeds vrij krachtig, terwijl er in III bijna geen makro- of

1) Ook onder overigens gelijke omstandigheden komt de phagocytose van roode bloedcellen steeds langzamer tot stand dan die van mikrogenen.

mikrophaag is, die niet met een of meer erythrocyten in phagocytair verband is getreden. Het niet gefixeerde alexine (IV) kan dus de phagocytose niet aan den gang brengen, terwijl het, na door bemiddeling van specifieke sensibilisatoren op de roode bloedlichaampjes gefixeerd te zijn, de op zich zelf reeds krachtige sensibilisatorwerking (II) nog vermag te versterken (III).

Dergelijke proeven heb ik ook met andere haemolytische sera (konijn-geit) verricht, en hun werking bestudeerd op de phagocytose van geiterythrocyten door verschillende soorten van leukocyten. De uitkomsten waren steeds in overeenstemming met de zooeven beschrevene. Haemolytische en haemopsonische (haemotrope) werking gingen bij de door mij onderzochte sera steeds parallel.

Mijn onderzoek is dus voor een goed deel eene *bevestiging* van de gegevens van Savtchenko, voor zoover namelijk ook ik de beteekenis van den gefixeerden amboceptor voor de phagocytose onder den invloed van immuunsera kon vaststellen. Doch het is er een *uitbreiding* van, nu het mij gelukte aan te toonen dat het complement, waaraan in normaalsera (na fixatie door den normalen amboceptor) de voornaamste opsonische functie toekomt, toch ook in immuunsera, waar de grootere beteekenis der specifieke amboceptoren ook hier in 't oog springt, nog eene werkelijk completeerende werking ontvouwt. In overeenstemming met mijne opvatting omtrent de rol der leukocyten bij het normaalopsonine neem ik ook hier aan dat in het mengsel II de phagocytose wordt ingeleid door leukocytaire complementproductie, waarvoor de gefixeerde specifieke amboceptor de prikkel is. Het effect wordt natuurlijk des te sterker, wanneer wij door toevoeging van een overmaat van versch serum aan het mengsel

resp. door het lege artis complementeeren der gesensibiliseerde cellen, deze laatste met alexine *verzadigen* (zooals in III).

In hoeverre komen nu deze gegevens overeen met de resultaten van andere moderne onderzoekers van de opsoninen der specifieke sera?

Al spoedig nadat men met de studie der bakterieele opsoninen was begonnen, verschenen er in de litteratuur ook mededeelingen over erythrocytenopsoninen. Hadden de betreffende onderzoekers Savtchenko's werk dan vergeten? Geenszins, en zij bestreden dit ook niet. Alleen meenden zij te kunnen vaststellen, dat Savtchenko's theorie niet voor alle gevallen geldt — dat er namelijk immuunsera bestaan, die vrij zijn van haemolytische amboceptoren, doch die wel degelijk bevorderend op de phagocytose werken. Zoo heeft Wakelin Barratt in een drietal publicaties de autonomie der erythrocytenopsoninen trachtten aan te toonen. Op de verschillen tusschen opsonine en agglutinine die hij vond, behoeven wij niet nader in te gaan — daarmede zijn wij 't, zooals uit 't voorafgaande gebleken is, volkomen eens. Nu had Barratt het serum van een duif in handen, die was voorbehandeld met kipbloed. Voegde hij nu bij eene suspensie van kiperythrocyten een dosis van dit serum, dan was er na 5 minuten complete agglutinatie doch na 24 uur bij 37° nog geen spoor van haemolyse opgetreden (59). Bracht hij echter duifleukocyten samen met kiperythrocyten en een weinig van het bewuste serum in geïnactiveerden toestand, dan: „After the lapse of an hour, at 37° C., about half the leucocytes present contained one or two, or rarely more, red blood cells.” Uit een en ander concludeert hij, dat de aanwezigheid van amboceptor niet in oorzakelijk

verband staat met de phagocytose, aangezien deze kan tot stand komen bij afwezigheid van amboceptor.

Tegen deze interpretatie nu zijn wel enkele bezwaren in te brengen. In de eerste plaats laat de beschrijving van de proef ons in 't onzekere omtrent de wijze waarop de completeering van het serum bij de haemolyseproef is verricht. Bovendien leert ons juist de phagocytoseproef dat, waar na een vol uur bij 37° slechts de helft der leukocyten heeft gefagocyteerd, het opsoninen- d. w. z. het amboceptorengehalte van het serum gering is geweest. Ik zie hier dus juist een zeker parallellisme tusschen haemolyse- en phagocytoseproef. Bovendien is het nog de vraag, in hoeverre leukocyten van de duif tot complementproductie in staat zijn. Maar er is meer. De onderzoekingsmethode van Bordet-Gengou heeft ons geleerd, dat een serum hetwelk bakteriolytisch vermogen ten opzichte van bepaalde mikroörganismen mist, toch nog wel degelijk op die mikroben passende amboceptoren kan bevatten. Naar analogie hiervan heeft men, bij het aantreffen van een serum dat niet haemolytisch werkt, niet het recht om tot de afwezigheid van alle haemolytische amboceptoren te besluiten, en om dan, wanneer zulk een serum toch opsonisch werkt, de opsoninen als op zichzelf staande stoffen naast de lysinen te stellen. Het is immers meermalen aangetoond en gemakkelijk te controleeren, dat specifieke sera in zulke verdunningen waarbij geen lytisch effect meer tot stand komt toch nog opsonische werking kunnen vertoonen. Zoo ook vindt men normale sera, die in de gewone concentratie genoeg „ambo-complement” bevatten om phagocytose van roode bloedlichaampjes te weeg brengen, doch niet voldoende om haemolytisch op deze te werken. Met 't oog op een en ander meen ik nu met eenig

recht te kunnen beweren, dat voor het tot stand komen van een opsonisch effect minder lysine (opsonine) noodig is, dan voor eene lytische werking. Met andere woorden: de vitale leukocytaire reactie is een nog fijner reagens op de aanwezigheid van opsonine (lysine) dan de haemolyse of de methode van Bordet-Gengou.

De verdere eigenschappen, die Barratt bij zijn opsonine waarnam, waren de volgende:

- 1°. Het opsonine wordt aan het serum onttrokken door behandeling er van met de roode bloedlichaampjes, waarmede men heeft geïmmuniseerd.
- 2°. Roode bloedlichaampjes, met het immuunserum behandeld, blijven ook na wassching het opsonine fixeeren.
- 3°. Het opsonine wordt niet door de leukocyten gebonden.

Tot zoover komen dus de eigenschappen dezer stof volkomen met die der amboceptoren overeen.

Nu blijkt echter volgens Wakelin Barratt:

- 4°. „The special constituent of serum which possesses the property of inducing phagocytosis is destroyed by heating.”

Nu denken wij daarbij natuurlijk 't eerst aan de gewone inactiveringstemperatuur, en het is ook juist op grond van deze eigenschap dat hij zijn erythrocytenopsonine met de thermolabiele opsoninen van Wright en Douglas identificeert. Deze mededeeling sub 4°. komt ons dan ook des te vreemder voor, waar Barratt juist met een lege artis geïnactiveerd immuunserum wèl phagocytose zag optreden. Hoe heeft de schrijver echter deze „destroying by heating” opgevat? Aldus: bij verhitting van specifiek haemolytische sera $\frac{1}{2}$ uur bij 100° C. (sic!) is de opsonische werking verdwenen; bij verwarming $\frac{1}{2}$ uur bij 69° voor een groot

deel. Mij dunkt, dat we hiertoe wel verder het zwijgen mogen doen!

Wakelin Barratt heeft voorts nog eene methode uitgedacht, om de opsonische sterkte van een erythrocyten-immuunserum quantitatief te bepalen, gemeten in vergelijking met een standaardserum (60). Dit kan op twee wijzen geschieden; òf wel „by determining the minimum amount of serum required to sensibilise a given bulk of red cells so as to produce the maximum degree of phagocytosis,” òf wel door te bepalen „the minimal bulk of red blood cells required to deopsonate the unit of volume of the sera.” Barratt heeft hiermede niets anders gedaan dan aangetoond, hoe men ook met behulp van de phagocyttaire of opsonische methode het relatief gehalte van een serum aan amboceptoren kan bepalen. En wil men nog verdere bewijzen ervan, dat Barratt met specifieke amboceptoren werkte? Ziehier: bij een gegeven hoeveelheid specifiek serum is de opsonisatiegraad afhankelijk van de hoeveelheid ter sensibiliseering toegevoegde roode bloedlichaampjes en van den duur van het contact. En ten slotte: de sensibilisatiegraad van een gegeven hoeveelheid roode bloedlichaampjes wordt niet door verdunning van het serum beïnvloed, zoo lang de verhouding $\frac{P}{S}$ constant blijft, d. w. z. wanneer slechts de oorspronkelijke hoeveelheden van bloedlichaampjes en serum dezelfde blijven (61).

Ook Keith (62) meent, dat er geen verband behoeft te bestaan tusschen haemolyse en phagocytose van roode bloedlichaampjes. Waarom hij nu in het door hem onderzochte runderhaemolytische konijnserum als milieu de heterologe menschenlijke leukocyten liet phagocyteeren, is niet duidelijk. Voorts werkte deze onderzoeker met verschillende verdunningen van het versche

en van het verwarmde immuunserum. Hij verloor daarbij echter uit het oog, dat het voor het opsonische resultaat geen bijzonder groot verschil maakt, of een immuunserum in actieven dan wel in geïnactiveerden toestand wordt verdund; hier toch komt het in hoofdzak op den amboceptor aan. Immers, zooals Wakelin Barratt ook reeds aantoonde, is het voor het quantitative fixatie-resultaat onverschillig of men bij een zekere hoeveelheid roode bloedlichaampjes een bepaalde dosis amboceptor voegt in meer of minder verdunden toestand. Voor het fermentatieve deel van het lysine, het complement echter, is de verdunningsgraad boven een zekere grens, zooals voor de enzymen in 't algemeen, wel degelijk van belang.

Keith heeft intusschen de vraag niet scherp gesteld. Hij vergelijkt het opsonine („the substance which induces phagocytosis”), waaraan hij trouwens een thermolabiel en een thermostabiel gedeelte toekent, met den amboceptor alléén en niet met het lysine als geheel. Had hij 't laatste gedaan, het parallellisme zou hem niet zijn ontgaan, en hij zou zich in zijne theoretische conclusies niet, zooals nu, van Dean hebben verwijderd.

Het is te begrijpen dat ook Neufeld zich met het onderzoek van de „haemotrope” werking van erythrocyten-immuunsera heeft bezig gehouden. Met Töpfer beschreef hij (20) een onderzoek met roode bloedlichaampjes in vitro, geheel analoog aan zijn werk met Rimpau over bacterieele antisera, en waarvan opzet en resultaten volkomen gelijklopend waren met die van Savtchenko. Dan volgt zeer naïef de mededeeling: „Nach Abschluss unserer Versuche fanden wir bei Durchsicht der Literatur, dasz gerade bei roten Blutkörperchen bereits Savtchenko und Tarassevitch Versuche in vitro vorgenommen haben.” De publicatie

zou dus overbodig zijn geweest, wanneer het Neufeld en Töpfer ten slotte niet nog gelukt was een anti-caviabloedserum van het konijn te vinden, dat sterk lytisch en agglutineerend, doch niet phagocytose-bevorderend werkte, (dus juist het omgekeerde van wat Wakelin Barratt vond). Savtchenko nu had met een gelijksoortig serum gewerkt, dat echter wel degelijk ook eene opsonische functie vertoonde. Neufeld bestrijdt de juistheid daarvan niet, doch wijst erop dat er bij de vorming van antistoffen meermalen individuele verschillen voorkomen. Voor hem is zijn vondst echter voldoende reden, om er een nieuw bewijs in te zien voor de niet-indentiteit van lysine en tropine.

Uit een later onderzoek met Bickel heeft Neufeld (63) nieuwe gegevens geput voor zijne opvatting van de werking der cytotrope sera. Bij een met roode bloedlichaampjes voorbehandeld dier kan volgens hem het gehalte van het serum aan haemotrope stoffen binnen enkele dagen belangrijke verschillen opleveren. Wij mogen hier met Levaditi wel vragen, of deze verschillen niet samenhangen met de door Neufeld zelf erkende vrij groote variabiliteit in de vitaliteit der gebruikte leukocyten. Overigens dient men de resultaten van al dergelijke experimenten, waarbij het haemolytisch en haemopsonisch vermogen van immuunsera wordt vergeleken, met bijzondere voorzichtigheid te beoordeelen, en wel omdat men hier werkt met verschillende methodes van onderzoek. De haemolyse toch kan slechts geconstateerd worden bij aanwezigheid van een voldoende hoeveelheid complement, terwijl men bij het opsonisch onderzoek door de voorafgaande inactivering complementwerking bewust uitsluit. Ik heb nu juist getracht aan dit bezwaar te ontkomen door het gebruik van versch paardserum als complement bij de phago-

cytoseproeven; zooals ik heb meegedeeld, was het resultaat zeer sprekend.

Het blijkt dus, dat reeds op het gebied der erythrocytenimmunsera, waar we werken met een object met constante eigenschappen, n.l. het roode bloedlichaampje, de meeningen verdeeld zijn. Des te begrijpelijker wordt het, dat bij de antibakterieele sera, waar het mikroben geldt met wisselende virulentie, en tengevolge waarvan men niet steeds onder dezelfde voorwaarden werkt, de inzichten omtrent den bouw der immunopsoninen sterk uiteenloopen.

Neufeld, in zijn onderzoek met Hüne (21), houdt zijne hypothese van de bakteriotropinen der immunsera staande, omdat hij geen paralellisme vond tusschen de bakteriotrope, de bakteriolytische en de complementfixeerende werking dezer sera. Nu geldt hier reeds a priori het zooeven genoemde bezwaar, n.l. dat deze drie functies op verschillende wijzen worden onderzocht: de eerste bij afwezigheid van vrij complement en met leukocyten als vitaal reactief, de tweede en de laatste meer als chemische reacties en bij aanwezigheid van complement. Indien nu de opsonische en bakteriolytische werking twee functies van dezelfde amboceptor zijn, dan is het toch zeer goed mogelijk dat bij het gebruik van reagentia van verschillende gevoeligheid de resultaten wel eens schijnbaar uiteen loopen, wanneer men niet voldoende met alle omstandigheden rekening houdt. Overigens zij hier uit de proeven van Neufeld en Hüne, die verricht werden met typhusbacillen en aanverwante soorten, het volgende aangehaald. Paratyphusbacillen worden in vitro nòch door hun eigen immunserum nòch door typhus-immunserum vernietigd. Omgekeerd werkt paratyphus-immunserum wel bakteriolytisch op bac. typhi. (dit geldt voor alle sera van

de Hogcholera groep). Voorts vertoont het ook eene opsonische werking zoowel op paratyphusbacillen als op bac. typhi. De conclusie nu, dat het paratyphus-immuun-serum voor de homologe bakteriën slechts tropinen, doch voor typhusbacillen tropinen en lysinen bevat, is minstens voorbarig. Toen de schrijvers dan ook trachtten, door digereeren van het serum met paratyphusbacillen de tropinen eruit te verwijderen, in de hoop dat de lysinen achter zouden blijven, bleek deze hoop ongegrond. Tegelijk met de tropinen voor bac. typhi en paratyphi waren ook de lysinen voor typhusbacillen verdwenen. Voor mij staat het dan ook vast, dat de beide onderzoekers hier slechts met één stof te doen hadden, n.l. met den amboceptor, te meer daar het paratyphus-serum ook een krachtige deviatie van het complement bleek te weeg te brengen (N. en H. pag. 33). Hun kwam dit laatste natuurlijk vreemd voor, omdat zij van de onjuiste praemisse uitgingen, dat bakteriolytische amboceptoren in het paratyphusserum ontbraken. Intusschen, paratyphusbacillen zouden waarlijk niet de eenige mikrobensoorst zijn, welker immuunsera lytisch vermogen missen en toch amboceptoren bevatten. (Bordet-Gengou). Verschillende vertegenwoordigers van de Hogcholera-groep, de groep der „Salmonelloses” van de Franschen, b.v. bac. suipestifer (Neufeld en Hüne), bac. paratyphi B (Töpfer en Jaffé, 64), pneumococcen, streptococcen, tuberkelbacillen en bac. pestis zijn daarvan voorbeelden. Er bestaat hier eenvoudig een grootere resistentie der lichamen van de met amboceptor beladen mikrogen tegen de fermentatieve complementwerking. Ook in het Pfeiffersche phenomeen blijft bij deze mikroörganismen de extracellulaire lysis uit, zooals Neufeld en Hüne zelven vermelden. Voor deze mikrogen nu speelt de phagocytose de beslissende rol, en eerst

intracellulair, waar de verhoudingen weer andere zijn dan daarbuiten, en waar zonder twijfel nog wel andere fermenten optreden dan het complement, daar worden ook deze resistente soorten vernietigd.

Het is mijne innige overtuiging, dat eene interpretatie als die van Neufeld c.s. slechts verwarring kan stichten. Immers, wanneer men uit de afwezigheid van lysis besluit tot het ontbreken van amboceptoren, en dan toch complementfixatie vindt in de proef van Bordet-Gengou, dan moet men of aan deze zoo vruchtbare onderzoekingsmethode hare beteekenis ontzeggen, of wel men is genoodzaakt om, ter verklaring van de complementdeviatie, wederom zijn toevlucht tot andere immuunstoffen te nemen. Met het op goede gronden aannemen van verschil in weerstandsvermogen bij de onderscheidene mikrobensorten tegenover extracellulaire lysis worden schijnbaar tegenstrijdige verschijnselen ons duidelijk. Voorshands is, naar mijne meening, éénheid van opvatting in zake het stoffelijke substraat van opsonische, lytische en complementbindende werking van immuunsera geboden, en ook voldoende gemotiveerd.

Levaditi is eveneens van meening (41), dat er alle reden is om de opsonische werking van immuunsera toe te schrijven aan de gecombineerde werking van amboceptor en complement. Men kan namelijk een geïnactiveerd specifiek serum niet alleen in bakteriolytisch, doch ook in opsonisch opzicht reactiveeren, d.w.z. de opsonische werking ervan doen toenemen door toevoeging van versch normaal serum, d. i. van complement. 1) Bovendien zijn deze thermostabiele opsoninen der immuunsera specifiek. Uit een typhus-serum kan men de typhusopsoninen wegnemen door

1) Levaditi laat zich er niet over uit of er, bij toepassing van verwarmd immuunserum, ook leukocytair complement in functie treedt.

behandeling van het serum met deze bacillen, doch niet met staphylococcen.

Het vraagstuk nu van de specificiteit der opsoninen, als ten nauwste samenhangend met de quaestie van de specificiteit der amboceptoren verdient nog nadere beschouwing. Bulloch en Western vonden (65) dat vaccinatie met staphylococcen alleen den index voor staphylococcen verhoogt, niet dien voor tuberkelbacillen. Omgekeerd verhoogt immunisatie met tuberculine T. R. slechts den index voor tuberkelbacillen, doch niet dien voor staphylococcen. Maar ook reeds voor het normale opsonine geldt deze specificiteit. Bulloch kon b.v. uit normaal menschserum, dat opsonisch werkte op staphylococcen, tuberkelbacillen en *bac. pyocyaneus*, de specifieke normale opsoninen stuk voor stuk wegnemen, door het serum achtereenvolgens met elk dezer drie mikrobensorten te behandelen. 1) Intusschen: „In almost all cases we have observed a slight diminution in the quantity of the opsonin left behind.” Het is voor ons nu duidelijk, dat telkens met den normalen amboceptor ook een deel van het complement werd gefixeerd, waardoor voor de volgende soort de index lager werd dan normaliter.

Wij hebben nu alle reden om aan te nemen, dat de verlaging van den opsonischen index bij infectieziekten berust op fixatie van den normalen amboceptor op de in het lichaam aanwezige mikrogen, waardoor het serumcomplement in vitro zijn functie niet of slechts zwak kan vervullen. Omgekeerd is de verhooging van den index na afloop eener spontane infectieziekte of door kunstmatig opgewekte immuniteit toe te schrijven

1) Deze specificiteit wordt geloofend door Axamit en Tsuda (98), echter op grond van enkele proeven die den toets der kritiek niet kunnen doorstaan.

aan de quantitatieve toename der specifieke amboceptoren. Zoo wisselt, bij constant blijven van het complement, de index met het gehalte van het serum aan de specifieke sensibilisatoren. Tot nadere verklaring van de verlaging van den index behoef ik slechts te herinneren aan het vroeger reeds meegedeelde feit, dat Wright bij locale infecties juist in de haard den „bakteriotropen druk” ’t meest verlaagd vond. Geheel in overeenstemming hiermede is het verschijnsel, dat bij actieve immuniseering van laboratoriumdieren dadelijk na eene intraveneuse bakteriënsputing de Pfeiffersche titer van het serum sterk afneemt, door binding van de in het bloed voorhanden amboceptoren aan de ingespoten mikrogen (66).

Intusschen, ook de specificiteit der amboceptoren is ten slotte eene relatieve. Waar de mikrogen, van een systematisch standpunt bezien, ver van elkaar verwijderd zijn, daar is het niet moeilijk ze door middel van immuniteitsreacties van elkander te onderscheiden. Voor verwante soorten levert dit echter moeilijkheden op. De verschillende typen van bac. dysenteriae (67), ook streptococcestammen van zeer verschillende herkomst (68, 69), bleken bij immuniseering onderling op elkaar passende amboceptoren te vormen. Gengou (70), later van Calcar (71) deelden mede, dat immuunsera van humane tuberkelbacillen sensibilisatoren kunnen bevatten die zich ook hechten aan stammen van saprophytische zuurvaste staafjes. Het is nu zeer opmerkelijk, dat deze overeenkomst zich ook bij de opsoninenproef vertoont. Sobernheim (72) had namelijk het serum van een paard in handen, dat met menschelijke tuberkelbacillen was geïmmuniseerd. Terwijl nu gewasschen cavialeukocyten geen noemenswaardige phagocytose van de voor de immuniseering gebruikte tuberkelbacillen

vertoonden, en normaal paardserum deze wel ietwat doch nooit sterk deed toenemen, gaf toevoeging van het immuunserum tot snelle en volkomen phagocytose aanleiding. Deze serumwerking was echter niet absoluut specifiek, want indien men voor de tuberkelbacillen zuurvaste bacillen uit smegma of uit koren in de proef substitueerde, dan vertoonde zich hetzelfde verschijnsel. Hetzelfde geldt voor andere nauw aan elkaar verwante soorten. *Bac. typhi* met paratyphus A en B, daarnaast de Hogcholeragroep (ty. murium, varkenspest, psittacose, en verschillende vleeschvergiftigingsbacillen), vertoonen zoowel ten opzichte van agglutinatie als van amboceptorvorming vaak overeenkomstige eigenschappen, waaruit ook juist voor een goed deel hun nauwe onderlinge verwantschap blijkt. Slechts door middel van zeer hoogwaardige immuunsera kan het gelukken, deze van elkander te differentieeren. Het behoeft ons dus niet te verwonderen, dat ook in het opsonische experiment deze scheiding vaak moeilijkheden met zich brengt. Niet aldus bij verder uiteenliggende soorten. Zoo vond ik b.v. bij eene genezen typhuspatiente, die sedert drie weken koortsvrij was, de volgende indices:

bac. typhi 3.72

bac. coli 0.93

bac. enteritidis Gärtner 0.99

terwijl ik een maand vroeger, toen tijdens de ziekte de index voor *bac. typhi* bij twee achtereenvolgende bepalingen 0.5 en 0.65 bedroeg, voor den Gärtnerschen bacil het cijfer 1.1 vond. De index voor den laatste was dus onder alle omstandigheden normaal gebleven (evenals die voor *bac. coli*), terwijl die voor *bac. typhi* met de reconvalescentie belangrijk was gestegen. Voor paratyphus A en B echter waren de resultaten, die ik zoowel bij verschillende typhuspatienten als bij geïm-

muniseerde konijnen verkreeg, te zeer uiteenlopend, dan dat ik daaruit voor 't oogenblik conclusies zou durven trekken. Voorshands geloof ik, dat de opsonische methode voor de differentieeldiagnose tusschen typhus en paratyphus te kort schiet. Anderen zijn in deze meer optimistisch gestemd. Hektoen (38) beschouwt de opsoninen van typhus en paratyphus als onderling verschillend en specifiek, hoewel hij zelf erkent dat de gevonden indices daarop niet altijd wijzen.

Intusschen, zooals ik zooeven reeds aantoonde, voor niet naverwante mikrogen zijn de verschillen zeer sprekend. Een tweetal voorbeelden daarvan mogen hier nog een plaats vinden. Bij een genezen typhus-patient heb ik den index bepaald, niet alleen voor typhus en voor cholera elk afzonderlijk, maar ook voor een mengsel van deze beide mikrogen. In het laatste geval namen de leukocyten naast typhusbacillen ook choleravibrionen op, van de eerste echter belangrijk meer. Ik telde in elken phagocyt zoowel het aantal typhusbacillen als het aantal choleravibrionen, en berekende den index voor elk van beide alsof het twee afzonderlijke bepalingen gold. Ik vond daarbij:

voor typhus 2.84

voor cholera 1.1

De leukocyten vertoonen dus een electief vermogen, eene eigenschap waarop Bordet reeds heeft gewezen (c.f. pag. 66), en die naar onze opvatting berust op de aan- of afwezigheid eener voldoende hoeveelheid passende amboceptoren.

Bij een ander door mij onderzocht geval gold het eene klinische differentieele diagnose. Een vrouw leed post partum aan een pneumonie, waarvan men op dat oogenblik klinisch niet kon uitmaken of deze op typhus en bodem berustte, dan wel of men te doen

had met eene pneumococceninfectie van de long of misschien met een tuberculeuse pneumonie. Er waren microscopisch geen tuberkelbacillen of pneumococcen in het sputum gevonden. „De bakterioloog werd er bij gehaald,” de opsonische index voor de drie mikroben waarom het hier ging werd bepaald, en ik vond de volgende cijfers:

voor pneumococcen 1) 0.85

voor tuberkelbacillen 0.44

voor typhusbacillen 1.13.

In zijn eerste publicatie met Reid geeft Wright (12) eenige indicaties voor het beoordeelen van opsonische gegevens, waar het geldt het stellen eener diagnose. Ik citeer daaruit het volgende: „Where an isolated bloodexamination reveals that the tuberculo-opsonic power of the blood is low, we may — according as we have evidence of a localised bacterial infection or of constitutional disturbance — infer with probability that we are dealing with tuberculosis — in the former case with a localised tubercular infection, in the latter with an active systemic infection.”

Op grond van een en ander kon ik typhus, waarvoor de index normaal was, uitsluiten en stelde ik de diagnose op een tuberculeus proces, waarschijnlijk gecombineerd met een secundaire infectie, in casu met pneumococcen, hetgeen bij longtuberculose waarlijk geen zeldzaamheid is. Voor zoover de pneumococceninfectie betrof durfde ik mij echter niet beslist uitspreken, aangezien de index hiervoor ongeveer op de grens lag. (Waarden tusschen 0.9 en 1.1 plegen wij in de opsoninentechniek nog als normaal te beschouwen). De waarschijnlijkheid werd

1) De pneumococcenstam was kort te voren door collega Marx en mij geïsoleerd en gekweekt uit een typisch *ulcus corneae serpens*.

intusschen wel grooter, toen een met het sputum der patiente geïnfecteerde muis aan pneumococcen-septichaemie te gronde ging. Hoe dit ook zij: de tuberculeuse aard van het proces stond voor mij vast. — De patiente stierf een paar weken later. Uit het sectieverslag neem ik over: pleuritis adhaesiva sinistra, tuberculosis miliaris pulmonum et hepatis, cystitis tuberculosa.

Na al het leerrijke en demonstratieve werk van Wright en zijn school was het misschien mijnerzijds overbodig om door eenige voorbeelden nog eens te wijzen op de waarde die de bepaling van den opsonischen index ook voor de kliniek kan hebben. Tevens is ons echter hiermede gebleken, dat wij ook daaruit nadere gegevens kunnen putten voor onze opvatting omtrent het wezen der opsoninewerking: onder overigens gelijke omstandigheden wisselt de intensiteit der phagocytose met het gehalte van het milieu aan passende immuunlichamen.

HOOFDSTUK VII.

OVER SPONTAANPHAGOCYTOSE.

Spontaanphagocytose in den eigenlijken zin van het woord is een begrip van den laatsten tijd. Het duidt aan: het opnemen van mikroben of andere corpuscula in een inactief milieu (in 't bijzonder physiologische zoutsolutie) door phagocyten die van alle serumbestanddeelen door wassching zijn ontdaan. In dezen zin scherp gedefinieerd is de aandacht op dit verschijnsel eigenlijk eerst gevallen, sinds Wright bij de toepassing van zijn techniek met gewasschen leukocyten begon te experimenteeren.

Zooals wij hebben uiteengezet, werd Wright zóózeer getroffen door het groote verschil in de intensiteit der phagocytose bij aanwezigheid resp. van versch en van verwarmd normaal serum, dat hij den invloed van het laatste over 't hoofd zag, dezen gelijk o stelde, en ten gevolge daarvan het opsonine als thermolabiel beschouwde. Hoogstens werd door hem, en ook door Bulloch en Atkin, de geringe residuale phagocytose toegeschreven aan een rest van opsonine, dat ten gevolge van onvoldoende wassching der leukocyten aan deze was blijven kleven. Dean vestigde nader de aandacht erop,

dat de residuale phagocytose moest worden veroorzaakt door een thermostabiele rest van het door hem als complex beschouwde opsonine. Het was voornamelijk Löhlein, die er op wees, dat leukocyten (in casu van de cavia), meermalen gewassen, nog in staat zijn allerlei mikroben — wanneer deze slechts een zekeren graad van virulentie niet overschrijden — in een indifferent milieu op te nemen, en zonder eenige hulp van serum intracellulair te digereeren. Hij toonde daarmede tevens aan, dat Wright en Douglas de praepareerende beteekenis van het versche serum hadden overschat. Deze onderzoekers toch hadden waargenomen (9), dat in hunne mengsels bestaande uit: gewassen menscheleukocyten, typhusbacillen en versch menschserum, de bacillen zoowel binnen als buiten de leukocyten in sphaerulatie waren overgegaan, terwijl dit verschijnsel ook intraphagocytair uitbleef bij gebruik van geïnactiveerd normaalserum. Zij besloten hieruit het volgende: „Of incidental interest in connection with the above experiments is the demonstration which they afford, that the spherulation of the intracellular ingested microorganisms, which has been often ascribed to the agency of the leucocytes is in reality due to agency of the blood fluids.” Dit nu is beslist onjuist. Het blijkt toch, dat niet alleen leukocyten van de cavia, maar ook die van den mensch in staat zijn, typhusbacillen intracellulair tot granula en verder te verteren — ook zonder de hulp van actief of in actief serum — wanneer men hun daartoe slechts langer dan 15 minuten, zooals bij de Wrightsche techniek, den tijd laat.

Wright heeft later, in samenwerking met Reid (23), het aandeel van de spontaanphagocytose in het opsonisch effect op tuberkelbacillen nader onderzocht, en in

't bijzonder de beteekenis van de zoutconcentratie van het milieu daarvoor trachten te bepalen. Hij bereidde daartoe mengsels van de volgende samenstelling:

- 1 vol. gewassen bloedlichaampjes, gesuspenseerd in NaCl-oplossing van 0.85 %,
- 1 vol. tuberkelbacillen, gesuspenseerd in gedestilleerd water,
- 1 vol. keukenzoutoplossing van verschillende concentratie.

Het bleek nu, dat de spontaanphagocytose daar het sterkst is, waar de concentratie van het keukenzout in het mengsel 0.6 % bedraagt, en dat de phagocytose tot 0 is gedaald bij de concentratie van 1.2 %.

Hamburger en Hekma hebben in hun meergemeld onderzoek (45) eveneens den invloed nagegaan van zuivere NaCl-oplossingen, zoowel hypotonische als hypertonische, op de phagocytose van koolpartikeltjes door paardleukocyten. Zij vonden de volgende getallen:

Hypotonische oplossingen.

NaCl-oplossing van	0.9 %	aantal koolhoudende leukocyten	31 %.
"	"	0.75 %	" " " 28 %.
"	"	0.6 %	" " " 21.8 %.
"	"	0.45 %	" " " 11.1 %.

Hypertonische oplossingen.

NaCl-oplossing van:	Procent-aantal koolhoudende leukocyten :	Daling van het phagocytair vermogen :
0.9 %	34.6	
0.95 %	33.5	3 %
1.0 %	11.84	60.6 %
1.1 %	10.8	69 %
1.2 %	0.7	98 %

Voor de maximale NaCl-concentratie van 1.2 % komen dus de resultaten van Wright en van Hamburger overeen, niet echter voor de hypotonische oplossingen. Hier toch vonden Hamburger en Hekma bij de con-

centratie van 0.6 % een duidelijke vermindering in de intensiteit van de phagocytose; haar hoogtepunt bereikt deze bij hen in de physiologische zoutoplossing.

Wright meende nu dat men, om tot eene zuivere bepaling van den opsonischen invloed van het te onderzoeken serum te komen, de spontaanphagocytose moest uitschakelen, door te zorgen dat de zoutconcentratie van het phagocyttaire mengsel iets meer dan 1 % bedraagt. Dit werd aldus bereikt:

Zoutconcentratie :	
1 vol serum	0.9 %.
1 vol. bloedlichaampjes, gewassen en gesuspendeerd in NaCl-oplossing van	0.85 %.
1 vol. tuberkelbacillen, gesuspendeerd in NaCl-oplossing van	1.5 %.
	3.25 %.
	3
	1.08 %.

Hier volge wederom ter vergelijking, wat Hamburger en Hekma vonden bij toevoeging aan het serum van verschillende zoutoplossingen:

bij ^{oplossing in het} ~~gelijke deelen~~ serum ~~van~~ 0.1 % keukenzoutoplossing, (d. w. z. totaalconcentratie van 1% Na Cl.): afname van het phagocytair vermogen van 17.3%.

bij ^{oplossing in het} ~~gelijke deelen~~ serum ~~van~~ 0.2% keukenzoutoplossing, (d. w. z. totaalconcentratie van 1.1% Na Cl.): afname van het phagocytair vermogen van 29.6%. 1)

Dit laatste moge ons eenigszins verduidelijken, wat Wright met het onderdrukken der spontaanphagocytose eigenlijk bereikt. Toch mag ik niet ontkennen, dat de resultaten van Hamburger en Hekma eenerzijds met die van Wright en Reid anderzijds niet geheel vergelijkbaar zijn, en wel omdat hunne onderzoekings-

1) Toch had ook een langdurig verblijf der leukocyten in dit mengsel van verhoogde osmotische concentratie, na overbrenging in normaal serum, geen blijvende benadeeling van het phagocytair vermogen ten gevolge.

objecten geheel andere waren, waardoor de voorwaarden der verschillende proeven nog al uiteenloopen.

Hoewel het reeds a priori niet geheel onverschillig schijnt, om opsonische reacties tot stand te doen komen in een anisotonisch milieu — uit vergelijkende proeven van Wright en Reid bleek dat dit er, binnen de genoemde grenzen (0.6 — ruim 1% NaCl.), weinig toe doet, indien slechts bij het bepalen van den index in de beide vergelijkende mengsels de concentratievoorwaarden dezelfde zijn. Wel waren in de mengsels met de physiologische zoutconcentratie de cijfers steeds hoger, zoowel voor versch als voor geïnactiveerd serum, dan in die met de hypertonische oplossing, waardoor in de eerste de beteekenis van het thermostabiele deel van het opsonine des te sprekender voor den dag komt. De schrijvers erkennen evenwel: „The source of fallacy to which attention is here called falls, no doubt, for all practical purposes, entirely out of account.” Voor praktisch-opsonische bepalingen is het onderdrukken van de spontaanphagocytose door verhooging van de osmotische concentratie van het milieu dan ook minstens overbodig.

De aldus aangetoonde spontaanphagocytose was natuurlijk koren op den molen van Metchnikoff. Hij die had aangetoond, dat leukocyten zelfs in gekookte urine een krachtige phagocytose kunnen vertoonen, had van oudsher weinig waarde gehecht aan de beteekenis der vochten voor het tot stand komen van dit proces, vooral in zake natuurlijke immuniteit. Het loont zeer zeker de moeite om in dit verband een zij 't ook vluchtigen blik te slaan op de wordingsgeschiedenis der phagocyttaire immuniteitsleer.

Voor al in den beginne vond het milieu bij Metchni-

koff al zeer weinig waardeering. Het geheele proces bij alle „réactions phagocytaires” wordt bepaald door de inhaerente chemotactische eigenschappen der leukocyten. In de 8e zijner „Leçons sur la pathologie comparée de l’inflammation” (1892) wijst de schrijver slechts terloops op de waarschijnlijke beteekenis der „différences physiques — et probablement bien d’autres encore — du milieu ambiant.”

Toen nu de humorale theorie der immuniteit opkwam, verzette de Metchnikoffsche school zich krachtig. Immers, de praemisse van de mannen der humores: de baktericide eigenschappen van het serum bij de natuurlijke immuniteit bleek onjuist, en de bewering dat de mikroben vóór ’t tot stand komen der phagocytose door serumbestanddeelen zouden zijn gedood of tenminste verzwakt, bestreed Metchnikoff door aan te toonen, dat sommige mikroörganismen *in* de phagocyten nog een wijle hunne bewegelijkheid kunnen behouden, en dat korten tijd te voren opgenomen mikroben nog verder kunnen worden gekweekt. De eindelijke vernietiging der bakteriën — zoo bewees hij daarmee tevens — geschiedt *in* de leukocyten, en niet daarbuiten.

In zijn standaardwerk „l’Immunité” (1901) schrijft Metchnikoff in zake natuurlijke immuniteit: „..... les phagocytes, pour débarrasser l’organisme d’un microbe et lui assurer une immunité naturelle, n’ont pas besoin du secours préalable d’un fixateur extraphagocytaire. Les phagocytes agissent pour ainsi dire motu proprio....,” en verder: „Les phagocytes entrent en lutte contre les microbes et en débarrassent l’organisme, sans avoir besoin d’aucun concours préalable de la part des humeurs.” 1) Een meer besliste ontkenning van de

1) I.c. hoofdstuk VII, pag. 212 en pag. 217.

beteekenis van het milieu voor het tot stand komen der phagocytose bij aangeboren immuniteit is bezwaarlijk te geven.

Geheel anders is de opvatting van den vader der phagocytenleer bij de verkregen immuniteit. Toen het namelijk bleek, dat er antisera zijn die, hoewel rijkelijk voorzien van specifieke antistoffen, toch alle baktericidie missen, — toen ook was aangetoond, dat deze sera wel aanleiding geven tot krachtige phagocytose, toen was het voor Metchnikoff duidelijk, dat de verkregen immuniteit haren grondslag vond in eene „action stimulante” der specifieke sera op de phagocyten, welke stimuleerende werking zou berusten op de aanwezigheid van stimulinen. 1)

Deze stimulinen prikkelen primair de leukocyten tot verhoogde werkzaamheid, en doen daardoor langs indirecten weg de microben als slachtoffers der leukocyten vallen. De opsonische theorie nu leert ons de opsoninen kennen als stoffen, die juist eene functie in omgekeerden zin uitoefenen: zij hechten zich primair op de microben, maken deze voor phagocytose geschikt, en beïnvloeden daardoor secundair de leukocyten — eene werking die bij normale en bij immuunsera slechts quantitatief verschilt. In deze tegengestelde opvattingen zien sommigen het bewijs voor een principieel verschil tusschen deze beide groepen van antistoffen.

In het artikel „Die Lehre von den Phagocyten und deren experimentellen Grundlagen,” dat Metchnikoff schreef in Kolle en Wasserman's Handbuch der pathogenen Mikroorganismen (1904), is er van stimulinen geen sprake meer. Hij is nu geneigd, de phagocytose bij verkregen immuniteit of die onder den invloed

1) l.c. pag. 286.

van specifieke sera toe te schrijven aan de fixateurs dezer sera, die de wegbereiders zijn voor het in de leukocyten aanwezige verteerende ferment, de cytase. (Ik wijs er op, dat deze verhandeling verscheen nà de publicatie van Savtchenko, die wij in het vorige hoofdstuk hebben uiteengezet). In normale sera, waar we ook phagocytose zien optreden en waar fixateurs volgens de methode van Bordet-Gengou niet zijn aan te toonen, neemt Metchnikoff sessiele fixatoren aan, waarvan de leukocyten, evenals van de cytase, de dragers zouden zijn. 1) In alle gevallen van phagocytose berust deze op de aanwezigheid van fixateurs; in de specifieke sera zijn ze echter in veel grootere hoeveelheid en vrij in de circulatie voorhanden.

Na het verschijnen van het zooeven besproken artikel in Kolle en Wasserman's handboek, en na de opkomst van de opsoninen-theorie, meenden sommigen (o. a. Sauerbeck: 73) dat Metchnikoff zijne stimulinen er aan had gegeven. Dat deze meening onjuist is, blijkt uit diens laatste publicatie over dit onderwerp (74), waar hij o. m. schrijft: „Die Opsoninversuche haben mehrere Forscher veranlasst die Hypothese einer Stimulinwirkung auf Phagozyten gänzlich zu verwerfen. Es scheint mir aber noch verfrüht ein definitives Urtheil darüber zu geben. Es ist ja hinreichend bekannt, dass die Einspritzung verschiedenartiger Substanzen, unter welchen auch das Blutserum normaler Tiere zu nennen ist. eine starke Ansammlung von Leukozyten hervorruft. In solchen Fällen müssen diese Zellen einen starken Reiz empfinden und zur Auswanderung stimuliert werden. Warum sollten sie sich anders verhalten, wenn man bakterienhaltige Flüssigkeiten in Körperhöhlen einführt?

1) l.c. pag. 375.

In dieser Frage der Stimuline müssen noch viele neue Versuche angestellt werden, welche hoffentlich die definitive Lösung fördern werden."

Deze woorden schijnen mij helaas niet geschikt om de zaak te verduidelijken; hier toch wordt het begrip der stimulinen als specifieke serumbestanddeelen verlaten, en uitgebreid tot alle stoffen die prikkelend op de leukocyten werken in den zin eener positieve chemotaxis. Het wil mij nu voorkomen, dat wij door de quaestie scherp te stellen veel ter vereenvoudiging en ter verduidelijking kunnen bijdragen. Wij bepalen ons tot de immuunsera waar de verschijnselen 't meest sprekend zijn, en zeggen: beide partijen constateeren verhoogde phagocyttaire activiteit onder den invloed van specifieke sera; de eene schrijft deze toe aan de aanwezigheid van stoffen die primair de leukocyten stimuleeren en aldus secundair tot versterkte phagocytose aanleiding geven, de andere partij zoekt de oorzaak in stoffen, die primair de mikroben opsoniseeren en aldus secundair prikkelend op de leukocyten werken. Het resultaat is in beide gevallen hetzelfde. Het wil mij nu toeschijnen, dat we de feiten alleszins recht doen wederbaren, door ons tot het aannemen van één dezer beide groepen van antistoffen te bepalen, en dan wordt de vraag eenvoudig deze: is de werking van deze phagocytose-bevorderende stof op de leukocyten een primaire of een secundaire? Ik behoef hier zeker niet nogmaals nader uiteen te zetten, waarom ik meen dat de opsonisch-bakteriotropische techniek voldoende duidelijk het laatste heeft aangetoond. Wij dienen dan ook de werking der specifieke sera niet in hun stimuleerende maar in hun opsoniseerende functie te zoeken, zoodat wij de eerstgenoemde terminologie moeten laten varen.

Iets geheel anders is het echter, wanneer wij na

inspuiting van een serum in de peritoneaalholte eene leukocytenophooping zien ontstaan. Wil men hier van stimuleerende, d. i. prikkelende werking in 't algemeen spreken, dan is daar niets tegen, maar deze heeft niets specifiek; hetzelfde effect wordt verkregen met bouillon, physiologische zoutsolutie, aleuronaat enz. Doch leukocytose en phagocytose zijn twee verschillende processen. Beteekenis voor het betreffende organisme verkrijgt deze leukocytenophooping dan ook eerst, wanneer er iets (b.v. mikroben) te phagocyteeren valt, en wanneer leukocyten en vochten samen in staat zijn de natuurlijke verdedigingsmiddelen van het mikroorganisme, nl. zijn negatief-chemotactische virulentie-eigenschappen te overwinnen, en het tot phagocytose te brengen. En dit is in de hoogste mate daar mogelijk, waar in de vochten specifieke immuunstoffen aanwezig zijn. Aangezien nu blijkt, dat deze stoffen eene primaire affiniteit voor de mikroben aan den dag leggen, is het zaak ze met den naam van opsoninen (resp. bakteriotropinen) te bestempelen, en den term stimulinen, die alleen duidt op een secundaire eigenschap dezer stoffen, niet verder te gebruiken. Bedrieg ik mij niet, dan moeten wij in de stimulinentheorie de veer zien, die Metchnikoff in den opsonischen strijd heeft moeten laten. Doch een andere, en meer kostbare lauwer mag hem niet worden onthouden. Hij toch heeft vooruitgezien, wat de moderne onderzoekingen over phagocytose hebben bewezen, dat „naakte” leukocyten 1) in staat zijn, geheel spontaan mikroben in zich op te nemen en te digereeren, en dat wij hierin hebben te zien een primaire inhaerente eigenschap der phagocyten. Nu is dit laatste natuurlijk slechts een woord, en eene omschrijving van het verschijnsel,

1) Hieronder versta ik leukocyten, door herhaalde wassching van serumbestanddeelen bevrijd, en in eene isotonische zoutoplossing gesuspenseerd.

doch geenszins eene verklaring. De verklaring nu ligt opgesloten in onze opvatting van het phagocytose proces, nl.: bij afwezigheid van (voldoende) opsonine in het milieu wordt dit, als inleiding van het verschijnsel, door de leukocyten geproduceerd. Voor deze opsoninesecretie is tijd noodig. Ziehier een voorbeeld, aan Levaditi (42) ontleend:

				Opsonisch vermogen:
menschelijke leukocyten	+	bac. typhi, 15 min. bij 38°		0.08
„	„	1 uur „	„	0.16
„	„	2 uur „	„	1.34

Deze cijfers geven Levaditi de volgende woorden in de pen: „Les sérums opsonisants ne font donc qu'exagérer plus ou moins la phagocytose qui peut s'opérer, quoique plus lentement, même en dehors de leur intervention.”

Ik wil het volgende voorbeeld uit mijn eigen aantekeningen hieraan toevoegen:

- | | | |
|---|---|---|
| a) gewasschen menschelijke leukocyten
emulsie van typhusbacillen
versch menschserum | } | na 15 min. bij 37°, phagocytair index: 5.4. |
| b) leukocyten en bacillen als in a)
i. p. v. serum, zoutsolutie | } | na 5 uur bij kamertemperatuur, phagocytair index: 10.6. |

Het doet in casu weinig ter zake dat het in a) gebruikte serum van een typhuspatient afkomstig was, daar ook de leukocyten in beide mengsels aan denzelfden lijder waren ontnomen. Behalve dat de uitkomst leert, dat ook de leukocyten van een lijder aan eene acute infectie hun phagocytair vermogen allerminst hebben verloren, lezen we uit deze cijfers tevens, dat een langdurig contact zonder serum een hooger phagocytair gemiddelde kan geven dan een kortdurend contact bij aanwezigheid van versch serum. Mocht

men nu echter toch nog bezwaren maken tegen het feit dat hier gewerkt werd met leukocyten van een koortsenden patient, dan volge hier nog een ander voorbeeld:

De leukocyten van een sedert korten tijd genezen typhuspatient gaven bij spontaanphagocytose een phagocytair gemiddelde van 1.0. Met het serum van den patient (dat dus het karakter van een immuunserum had) steeg de index tot 8.2, hetgeen — indien nog noodig — wel een bewijs ervoor was, dat de toename van de phagocytose bij immune individuen niet aan de immuun-leukocytose maar aan het immuunserum is gebonden. Dit bleek nog duidelijker, toen ik de spontaanphagocytose door leukocyten van dezen ex-patient en die door leukocyten van een normaal persoon (die nooit aan typhus had geleden) geheel onder gelijke voorwaarden vergeleek; de verhouding van deze beide gaf als index 1.2. De beide phagocytensoorten functioneerden dus in gelijke mate.

In het 4^e hoofdstuk hebben wij vastgesteld, in hoe sterke mate reeds betrekkelijk kleine wijzigingen in de componenten of in de uitwendige verhoudingen van het complete phagocyttaire mengsel invloed kunnen oefenen op het resultaat. Het behoeft ons allermint te verwonderen, wanneer blijkt dat dit voor mengsels met naakte leukocyten nog in sterkere mate geldt. Levaditi wees reeds, zooals we zagen, op de beteekenis van den duur van het contact. Nog gewichtiger is de invloed van den virulentiegraad der mikroben. Hierop wijzen de volgende vergelijkende experimenten:

Een miltvuurstam werd op runderserum gekweekt en vormde daar kapsels. De oorspronkelijke en de op serum gekweekte bacillen werden daarna in twee afzonderlijke mengsels aan de spontaanphagocytose door menschelijke leukocyten overgeleverd. In de

praeparaten van het eerste mengsel hadden 75 % der leukocyten gefagocyteerd, in die met de serumcultuur echter 58 %.

Met denzelfden miltvuurstam van de zooeven beschreven proef werd een muis intraperitoneaal geïnfecteerd. Na den dood van het dier werden de bacillen uit de buikholte op agar verder gekweekt. Daarna werden in twee mengsels naast elkaar de oorspronkelijke cultuur en die na één dierpassage met gewassen menschleukocyten samengebracht. Het resultaat was, dat 73 % der leukocyten bacillen van de avirulente cultuur hadden opgenomen, terwijl slechts 14.6 % de virulent gemaakte cultuur tot zich hadden kunnen nemen.

Verdere gegevens uit eene nog niet afgesloten proevenreeks over dit belangwekkende onderwerp moet ik voorloopig achterwege laten; ik hoop daarop te zijner tijd elders terug te kunnen komen. Ik ben er intusschen van overtuigd, dat voortgezet onderzoek naar de quantitatieve verhoudingen tusschen virulentie en opsonificatie zeker rijke vruchten zal afwerpen.

Dit alles in verband ook met hetgeen ik voornamelijk in hoofdstuk V heb meegedeeld omtrent de phagocytose van bac. anthracis door verschillende leukocytensoorten, spontaan en bij aanwezigheid van serum, geeft ons het recht tot het stellen van de volgende conclusies:

1. Vele soorten van leukocyten bezitten het vermogen tot spontane phagocytose van verschillende mikroben, binnen zekere grenzen van virulentie.
2. Normaal en immuunserum doen deze spontaan reeds mogelijke phagocytose quantitatief toenemen.
3. Bij afwezigheid van opsonine in het milieu wordt dit door de phagocyten zelve geproduceerd.

Deze laatste stelling vereischt nog eenige nadere toelichting. Zooals wij gezien hebben zijn niet alle

soorten van leukocyten tot opsonine-secretie in staat. Kikvorschleukocyten b.v. missen deze eigenschap onder de voorwaarden der proef. Moet men dan aan hun protoplasma ten eenenmale alle complementproductie ontzeggen? Het schijnt van niet. Ik heb van eene emulsie van goed gewasschen kikvorschleukocyten volgens de Büchnersche methode een extract gemaakt door deze driemaal achtereenvolgens te laten bevriezen en weer ontdooien. Met dit, door centrifugatie van celresten bevrijde extract heb ik gesensibiliseerde runder-roodebloedlichaampjes tot eene, zij 't ook zeer zwakke, haemolyse kunnen brengen. Maar afgescheiden hiervan, constateeren wij in elk geval, dat kikvorschleukocyten, onder overigens geheel dezelfde uitwendige voorwaarden, in phagocytair opzicht iets missen, dat de leukocyten van alle door ons onderzochte warmbloedigen (mensch, hond, konijn, cavia, kip), zij 't ook in verschillende mate, blijken te bezitten. Zouden we hier stuiten op een principieel biologisch verschil tusschen de leukocyten van warm- en koudbloedigen? Of in 't algemeen tusschen die van lagere en van hogere dieren? Ik hoop in de gelegenheid gesteld te worden, dit belangwekkende vraagstuk te zijner tijd nader onder de oogen te zien; nu wil ik nog slechts de aandacht vestigen op het feit dat Ruediger en Davis vonden (75), dat de leukocyten van verschillende door hen onderzochte poikilotherme dieren na wassching hun phagocytair vermogen hebben verloren.

Is deze opvatting omtrent het produceeren van opsonine door levende leukocyten nieuw? Ja en neen. Ja, voor zoover men hetzij de opsoninen als stoffen sui generis wil blijven beschouwen, hetzij in de opsonische werking eene op zichzelf staande functie van het lysine wil zien, en naar gelang van de omstandig-

heden wil spreken van opsonische of van haemolytische amboceptoren en complementen. Niet nieuw is ze naar mijn eigen meening, voor zoover ze — de identificatie van opsonine en lysine vooropstellende — eene noodzakelijke en consequente uitbreiding is van Büchner's theorie van de vitale alexineproductie der leukocyten.

Men zal niet van mij verlangen, dat ik deze krachtig bestreden maar ook sterk verdedigde leer hier in extenso ga uiteenzetten. Men zou aan de behandeling ervan een afzonderlijk proefschrift kunnen wijden! Ik wil hier alleen even aangeven, op welke experimenteele gronden ze berust:

1. Leukocytenrijke exsudaten werken sterker baktericide dan 't serum van het betreffende dier.
2. Bij vernietiging van leukocyten op verschillende wijze komen er baktericide stoffen vrij.
3. De baktericide van het bloed stijgt en daalt met de hoeveelheid leukocyten daarin.
4. Het van leukocyten ontdane vloeibare gedeelte van een exsudaat werkt sterker baktericide dan het bloedserum van het betreffende dier.
5. Uit levende leukocyten, die met een heteroloog serum in aanraking zijn gebracht, gaan baktericide stoffen in het medium over.

Büchner dan wees erop, dat de oorspronkelijke orthodoxe formuleering der phagocyttaire theorie ons niet voldoet, wanneer wij in vivo naast de phagocytose als zoodanig en naast de intracellulaire digestie geene extracellulaire medewerking der vochten zouden mogen aannemen. Hij beschouwde de latere meening der Metchnikoff'sche school, dat n.l. leukocyten — zij 't ook alleen na hun dood door phagolyse — alexine aan het milieu kunnen afstaan, reeds als eene gewich-

tige concessie. Steunende nu op de onderzoeken vooral van Lachtchenko (76) en Trommsdorf (77), eischte hij van den vader der leukocytenleer ook nog de erkenning, dat de leukocyten reeds bij hun leven tot alexinesecretie in staat zouden zijn.

Tot deze laatste concessie echter is Metchnikoff nooit gekomen — tenminste niet bewust. Maar zou hij dan in staat zijn, onbewust iets te erkennen wat hij onjuist acht? Ziehier, hoe de vork in den steel zit. In de eerste van de drie door hem in 1906 te Londen gehouden „Harben lectures” (78) behandelde Metchnikoff het werk van Wright; daarbij kwam ook de spontane phagocytose ter sprake, en naar aanleiding daarvan merkte de spreker het volgende op.

„Wright had himself in his later publications acknowledged the occurrence of spontaneous phagocytosis, i. e. phagocytosis which became apparent without any addition of opsonins. One might suppose that in these cases of spontaneous phagocytosis the opsonin, should it really be indispensable, might be secreted by the leucocytes. Thus these cells, having been transferred into normal saline solution and finding no opsonin in the surrounding liquid, might themselves give off enough of it to allow them to envelop the microbes. This supposition had not yet been experimentally verified, but should it be confirmed it would prove that the phagocytes were capable of producing substances preparatory to phagocytosis. If the opsonins were identical with the sensibilising substances the problem might be considered as already solved, for the phagocytes are without a doubt one of the sources of these latter substances.”

Aangenomen nu de juistheid van mijne opvatting omtrent de identiteit van opsonine en lysine, dan is in

bovenstaand citaat door Metchnikoff implicite toegegeven de mogelijkheid der vitale productie niet alleen van sensibilisator maar ook van alexine door de leukocyten. Nu was het juist de phagocytose en de intracellulaire digestie bij aanwezigheid van normale sera, waarin volgens Bordet-Gengou geen thermostabiele immuunlichamen zijn aan te toonen, die Metchnikoff bracht tot het aannemen niet alleen van intraleukocyttaire cytaseproductie, doch ook van in de phagocyten sessiele amboceptoren. Wat behoeft hem nu, na zijne boven aangehaalde woorden, nog te weerhouden, om aan de sessiele fixateurs en cytase ook mobiliteit toe te kennen? Ik citeerde Metchnikoff's verklaring in haar geheel omdat ik meen dat het gewicht er van voor ons onderwerp niet genoeg kan worden gewaardeerd.

In tegenstelling met de communis opinio meen ik, dat ook Bordet reeds vroeger niet zóó orthodox in zijne phagocyttaire geloofsovertuiging was, dat hij eene alexinesecretie door levende leukocyten ten eenenmale uitsloot. Dit heb ik tenminste opgemaakt uit zijne magistrale verhandelingen uit de '90-er jaren (79, 80, 81). Ik zou tot staving dezer bewering meerdere citaten daaruit kunnen aanvoeren, doch ik wil mij tot dit eene voorbeeld bepalen (81). Wanneer men aan een dier, zoo schrijft hij, preventiefserum toedient, dan verschaft men het de specifieke thermostabiele preventieve stof („substance sensibilisatrice”), welke het niet of in onvoldoende mate bezat. De bactericide stof, het alexine, is normaliter reeds in het organisme voorhanden. Deze beide nu moeten elkander ontmoeten, om samen het antiseptische mengsel te vormen. Waar heeft deze ontmoeting plaats? Daar, waar de bactericide stof is opgehoopt, nl. *in* de leukocyten. Intusschen: „Ce mélange ne s'opérera au dehors des cellules que lorsque

celles-ci auront, pour une cause quelconque, laissé diffuser dans le liquide ambiant une partie de l'alexine qu'elles renfermaient." Het is duidelijk dat „pour une cause quelconque" eene andere mogelijkheid dan phagolyse geenszins uitsluit. Ik weet trouwens met zekerheid, dat Bordet de normale aanwezigheid van alexine in de circulatie wel waarschijnlijk acht — evenwel in zeer geringe concentratie (c.f. Gengou's vergelijkende bactericidieproeven met plasma en serum: 82). En waarom de concentratie zoo zwak is? In de totale plasma-massa van het circuleerende bloed moet de verdunning wel sterk zijn. Ook weten wij immers, dat allerlei cellen en orgaanemulsies complement kunnen binden — en bestaat daartoe niet steeds de gelegenheid bij het voortdurende physiologische weefselverval in het organisme? Bovendien wordt er ongetwijfeld steeds complement in de circulatie-stofwisseling omgezet en tot uitscheiding gebracht.

Zoo willen wij dan in den door ons bedoelden zin het opsonine, d. i. het „ambo-complement" als een normaal secretieproduct der leukocyten beschouwen. Wij zouden al zeer slechte en inconsequente cellulair-pathologen zijn, wanneer wij de leukocytaire opsonine-productie, zooals wij die in den stijd tegen mikrobeen waarnemen, als eene kwalitatief nieuwe eigenschap der witte bloedcellen zouden beschouwen!

Ik ontveins mij niet, dat het hier gaat om een zeer gewichtig en veel bestreden onderdeel der phagocytaire theorie, waarop wij — om niet al te zeer uitvoerig te worden — hier niet verder zullen ingaan. Men ziet, tot welke ver-strekkende consequenties onze uitwerking van de theorie der opsoninen noodzakelijkerwijze voert. Slechts nog dit: heeft Levaditi dan misgetast in zijn experimentum crucis (83): het uitblijven van het Pfeif-

fer'sche phenomeen bij choleravibrionen, die in de circulatie van geïmmuniseerde cavia's worden ingespoten? Ik geloof van niet, daarvoor zijn de mededeelingen van hem en van Metchnikoff te precies, de afgebeelde praeparaten te duidelijk, en daarvoor staat ons ook Levaditi's technische vaardigheid borg. Alleen meen ik, dat 't ook hier gaat om deze beide gewichtige voorwaarden van elke chemische reactie: de hoeveelheid en de tijd. Ik ben er dan ook van overtuigd:

- 1°. dat de normaliter in het plasma aanwezige hoeveelheid complement te gering is, om binnen 5 minuten (na welken tijd de praeparaten gemaakt werden) extracellulaire lysis der choleravibrionen te veroorzaken.
- 2°. dat echter — ook wanneer bij langer wachten de complementproductie zou zijn toegenomen — er toch reeds, dank zij de aanwezigheid der specifieke fixateurs, totale phagocytose zou zijn opgetreden, vóór er nog in het plasma veel van vibriolyse te zien zou zijn.

Het mikroörganisme van de cholera is steeds een dankbaar object geweest voor het aantoonen van de aan- of afwezigheid van bakteriolytisch complement. Er zijn intusschen, bij al dergelijke onderzoeken twee bronnen van fouten aan te wijzen, die naar mijne meening voor een goed deel verantwoordelijk moeten worden gesteld voor den strijd der meeningen op dit gebied.

In de eerste plaats weten we, hoe buitengewoon gevoelig choleravibrionen zijn voor uitwendige schadelijke invloeden, en hoe spoedig er — ook zonder dat er serumlysine aanwezig is — involutievormen optreden in den vorm van bolletjes, zooals ze zich ook voordoen onder den invloed van de samenwer-

king van amboceptor en complement. Ik geloof dan ook zeker, dat men meermalen uit de aanwezigheid van zulke normale involutievormen ten onrechte tot de aanwezigheid van bakteriolysine heeft besloten.

Het andere struikelblok bij deze soort van proeven is de phagolyse. De beide uitersten, beslist normale en zeker gedegenereerde leukocyten zijn gemakkelijk genoeg te herkennen. (Men hebbe steeds de zekerheid, dat men de leukocyten bij de behandeling van het praeparaat niet al te zeer heeft geschaad, b.v. fixatie bij niet volkomen indroging, schroeien van 't praeparaat bij de fixatie in de vlam, sterke verwarming bij het kleuren). Er komen echter velerlei overgangsstadia voor, waarbij men het antwoord op de vraag, of een bepaalde leukocyt bij het vervaardigen van het praeparaat nog levenskrachtig was, dan wel of er reeds beginnende degeneratie bestond, schuldig moet blijven.

Ik heb nu goed gewasschen menschelijke leukocyten samengebracht met een jonge cholera-cultuur, en als contrôle daarnaast bij eene hoeveelheid van dezelfde cultuur inactief normaal menschelijk serum gevoegd. Na een contact van 6 uur werden van beide mengsels praeparaten gemaakt. Die, welke uit den inhoud van het eerste buisje waren vervaardigd vertoonden phagocytose met intracellulaire digestie der opgenomen mikroben, maar daarnaast waren ook de extracellulaire vibrionen voor een deel korrelig vervallen; in het tweede buisje was slechts agglutinatie opgetreden, zonder dat de vibrionen hier tot granula waren getransformeerd. Ik ben dan ook geneigd, uit de eerstgenoemde proef, tot steun mijner opvatting, dit drietal conclusies te trekken:

- 1°. dat er in het milieu complement (en amboceptor) moet zijn opgetreden.

- 2°. dat deze slechts van de leukocyten afkomstig kunnen zijn.
- 3°. dat dit gesecerneerde „ambo-complement” tegelijk eene opsonische en eene lytische functie heeft uitgeoefend.

Tot de zoogenaamde „teere” bacillen, mikroben die zeer gevoelig zijn voor bakteriolytische invloeden, behooren na *vibrio cholerae asiaticae* ook *bac. typhi* en *bac. coli*. Van de spontaanphagocytose van colibacillen door goed gewasschen cavialeukocyten schrijft Löhlein (31): „Il n'y a pas de transformation granuleuse en dehors des cellules pendant les 30 à 40 minutes qui suivent le commencement de l'expérience.” Mag men hieruit opmaken, dat dit na dien tijd wel het geval was? (*In* het leukocytaire protoplasma begint de granulaire transformatie reeds enkele minuten na de opname). Over een geheel analoge proef met cholera-vibrionen echter deelt Löhlein mede: „Ce n'est qu'après un temps assez long ($\frac{3}{4}$ d'heure en général) que l'on rencontre parfois des granulations et des vibrions altérés en dehors des cellules, souvent en petits groupes entourés d'une substance apparemment glaireuse. En même temps, on observe des leucocytes qui offrent les signes nets de phagolyse: augmentation de volume, gonflement du noyau.” Er zou dus volkomen overeenstemming bestaan tusschen het resultaat van mijn bovenbeschreven proef met cholera-vibrionen en deze mededeelingen van Löhlein, ware het niet, dat de laatste weer met phagolyse was komen aandragen, waarvan ik in mijn geval niet kon zeggen dat de „signes nets” waren. Hoe dit ook zij, in onze conclusies aangaande het wezen der zaak zijn Löhlein en ik het vrijwel eens, o.m. ook naar aanleiding van het volgende verschijnsel.

Naakte leukocyten kunnen in 't algemeen slechts

avirulente mikrogen opnemen. Verricht men nu daarnaast een vergelijkende proef, waarbij aan de gewasschen leukocyten behalve mikrogen ook versch normaalserum wordt toegevoegd, dan is alleen in de eerste stadia de phagocytose in het mengsel met serum die in het eerste buisje vooruit; later echter, na enkele uren, is er geen verschil meer in de intensiteit der phagocytose bij beide proeven aantoonbaar. In dien tijd hebben dus de naakte leukocyten de gelegenheid gehad, om voldoende opsonine te produceeren. Op deze toename van de phagocytose met den reactietijd hebben wij ook reeds op pag. 138 gewezen. Löhlein, aan het slot zijner onderzoekingen (32), aarzelt dan ook niet om aan te nemen, dat de phagocytose steeds plaats vindt met behulp van eene opsonische werking, die aan de opname voorafgaat, „et que le leucocyte, en l'absence d'opsonines libres, est à même de fabriquer lui-même ces substances. Les opsonines sont donc d'après nous d'origine phagocytaire,” waarbij hij echter het complement van de opsonische werking uitsluit en deze beperkt tot eene functie der „fixateurs phagocytaires”.

De quantatieve opsonisatie van mikrogen door een bepaald serum springt zóózeer in 't oog, dat Wadoux b. v. (84) de waarde van een pestserum wil bepalen door toepassing van de opsonische methode in vivo, en wel in het cavia-peritoneum — een proef dus, parallel aan de Pfeiffer'sche reactie, maar betrokken op het leukocytair gebeuren. Dat nu deze opsonisatie onder omstandigheden berust op de quantatieve neutralisatie van de virulentie der mikrogen, blijkt al zeer duidelijk uit een proef van Löhlein (85), die waarnam dat pestbacillen „van de tweede generatie,” die evenals kapselvormende miltvuurbacillen en streptococcen door

de leukocyten in het peritoneum van de marmot worden geweigerd, gretig door deze worden opgenomen na toevoeging van immuun-pestserum. Ik haal dit voorbeeld hier nog even aan, om het des te begrijpelijker te maken, dat naakte leukocyten, die natuurlijk slechts tot een zeer beperkte opsonificatie in staat zijn, bij afwezigheid van (voldoende) opsonine in het milieu niet zooveel daarvan kunnen produceeren, om de virulentie der aanwezige mikroben te neutraliseeren. En dat het vermogen tot opsonineproductie ten opzichte van eenzelfde mikrobentam bij de leukocyten van verschillende diersoorten sterk kan uiteenloopen, leerde ons reeds kolom II van de tabel op pag. 70. Bordet, in zijn Amsterdamsche rede, sprak het ook zoo duidelijk uit: „La composition cellulaire porte le cachet de l'espèce. Ces différences spécifiques ne peuvent être abolies. Quelque soit le traitement appliqué à un animal, toujours il subsistera entre ses phagocytes et ceux d'une autre espèce, des dissemblances d'ordre chimique que l'on peut déceler.” (86).

Ik wensch nu in dit verband de aandacht te vestigen op een verschijnsel, op welks beteekenis tot nu toe — voor zoover ik weet — nog niet is gewezen. Om ons dan tot miltvuurbacillen te bepalen: bij het bestudeeren van het gedrag van verschillende leukocytensoorten ten opzichte van eenzelfde miltvuurstam, of wel bij het nagaan van het phagocytair vermogen van één leukocytensoort ten opzichte van miltvuurstammen van verschillende virulentie, treft het ons, dat er tusschen het tot stand komen van phagocytose en het uitblijven ervan nog een tusschenvorm voorkomt, waarvan het typische is, dat daarbij de meerderheid der leukocyten niet werkeloos blijft, ook niet tot phagocytose overgaat, doch het brengt tot contact met de bacillen; de leuko-

cyten vleien zich tegen deze aan, en daarbij blijft het. Zoo gedragen zich b. v. de gewasschen leukocyten van hond en kip tegenover mijn miltvuurstam—Brussel, terwijl die van cavia en konijn onder dezelfde omstandigheden krachtig phagocyteeren, en die van de kikvorsch niets presteeren (pag. 70, tabel, kolom II). „Natura non facit saltus,” en we constateeren hier dan ook het bestaan van continue overgangen in het productievermogen van opsoninen.

Terwijl nu mijn eigen leukocyten, gewasschen, nog krachtige spontaanphagocytose van miltvuurbacillen vertoonen (Neumann vond hetzelfde voor de zijne — 33), zagen Wright en Douglas (9), dat menschelijke leukocyten, met hun miltvuurstam samengebracht, bij aanwezigheid van inactief normaal menschserum „had not drawn themselves into intimate contact with the anthrax threads,” en dat er zelfs bij aanwezigheid van versch serum nog leukocyten waren, die „were found to have extended themselves in a characteristic grasping manner along the bacterial threads.” Gruber en Futaki (87) zagen de leukocyten van cavia en konijn bij de door hen gebezigde miltvuurbacillen slechts tot „Umklammerung” komen. — Na al onze voorafgaande uiteenzettingen is het zonder twijfel voor den lezer duidelijk, dat er hier verschillen in virulentie tusschen de gebruikte miltvuurstammen moeten hebben bestaan. Ook Ribbert (88) constateerde „eine Umhüllung der Bakterien durch zahlreiche Zellen auch ohne Phagocytose,” en Gruber vertelt ons van een onderzoek van Ruziczka (89), waarbij bleek dat leukocyten zich ook tegen roode bloedlichaampjes kunnen aanleggen, en deze aldus in plaats van „verdauen” kunnen „andauen” (zooals Gruber het zeer scherp uitdrukt), zonder ze echter in hun binnenste op te nemen. En al kunnen we nu ook in

het laatste geval niet werken met het virulentiebegrip, in het algemeen geldt de regel dat, waar in het milieu niet voldoende opsonine aanwezig is, of de phagocyten te weinig secerneeren om het tot phagocytose te laten komen, dat daar nog het beschreven contactverschijnsel kan optreden.

Gegeven nu onze stelling, dat de phagocyten tot opsonineproductie in staat zijn, en dat opsonine identiek is met lysine, daar dringt zich ook de vraag aan ons op: hebben leukocytenextracten dan ook een krachtig opsonisch vermogen? En zoo niet: hoe komt het dan toch, dat wij in de bron zelve zoo weinig vinden van de stof die er naar onze opvatting door wordt geleverd? — Dezelfde vraag geldt immers ook voor het complement, en is juist aanleiding tot zooveel strijd geweest.

Levaditi nu vond geen opsonische werking in Buchner'sche leukocytenextracten, Neumann slechts een uiterst zwakke. Dit zou overeenkomen met de resultaten van de Pfeiffer'sche school, die zich zoo krachtig verzette tegen Metchnikoff en zijn leerlingen, welke laatsten met de Münchener (Buchner) en de Leuvensche (Denys) school den leukocytairen oorsprong der alexinen waarschijnlijk hadden gemaakt. Moxter, (90) als een der Pfeifferianen hield vol dat, indien de leukocyten de bron der alexinen waren, de concentratie van deze stoffen *in* de phagocyten sterker moest zijn dan daarbuiten in het serum, en dat dus maceraties en extracten van witte bloedlichaampjes een bijzonderen rijkdom aan bakteriolytinen, of tenminste aan lytisch complement moesten vertoonen. Dit nu blijkt niet, en daarom zou de theorie zijn veroordeeld.

Het zij mij veroorloofd, naar aanleiding van dezen strijd eene vergelijking te maken. Stel u voor, dat er

reuzen waren die in grootte-verhouding tot ons stonden als wij tot onze leukocyten, en dat zij ons doen en laten onder hunne microscopen bestudeerden. Stel u voor, dat het aan dit reuzengeslacht gelukt ware, urine constant in onze omgeving chemisch aan te toonen, en dat er nu onder hen een hevige wetenschappelijke strijd ontbrandde over de vraag of deze urine door ons werd geproduceerd. De partij, die alle verband tusschen den mensch en de urine wilde ontkennen, meende hare zienswijze niet beter te kunnen staven dan door aan te toonen dat extracten, emulsies en maceraties van fijngemaakte menschenlichamen niet of nauwelijks de chemische reacties van urinebestanddeelen vertoonden!

Ik weet het: *omnis comparatio claudicat*. Maar hadden deze reuzen gelijk? En moeten wij handelen zooals zij? Mogen wij dan geheel vergeten, dat het complement een ferment is, en dat elk ferment in de cel die het produceert als proferment aanwezig is? En zouden de ingrepen die wij den leukocyten doen ondergaan wel het ware middel zijn om dat zymogeen in zijne actieve modificatie om te zetten?

Wij weten, dat vrijwel alle bekende profermenten, zooals b.v. pepsinogeen, prochymosine, trypsinogeen, en waarschijnlijk ook prothrombine door middel van verdunde zuren geactiveerd kunnen worden. En nu wil ik in dit verband eraan herinneren, dat onderzoekingen met Ehrlich's neutraalrood hebben geleerd, dat de intraleukocyttaire digestie van mikroben geschiedt in een milieu (hetzij in of buiten vacuolen) hetwelk een zwak zure reactie vertoont. 1) Men behoeft nu deze feiten slechts met elkander in verband te brengen, en men zal mij moeten toegeven, dat de niet-aanwezigheid

1) Metchnikoff, *Immunité*, pag. 191 e.v.

van opsonine of alexine in leukocytenextracten, of het geringe opsonische of completeerende vermogen dezer extracten niets bewijst tegen de opvatting dat de leukocyten als de physiologische producenten van opsonine en alexine beschouwd moeten worden. 1)

Ik meen, dat men tot nu toe nog niet heeft gedacht aan de waarschijnlijkheid van een intraleukocytair zymogeen voorstadium van het complement. De toekomst zal leeren, of er in deze hypothese eenige vruchtbaarheid schuilt.

Met deze beschouwingen kunnen wij dit hoofdstuk, en daarmee dit geschrift besluiten. In de inleiding sprak ik als mijne meening uit dat de opsoninenonderzoekingen een succes voor de Metchnikoff'sche theorie zijn geweest. En al moge nu ook gebleken zijn, dat wij voor de verklaring der gevonden verschijnselen aan de stimulinentheorie geen behoefte hebben, de grondslagen der phagocytenleer blijven hierdoor onaangetast. Want juist de erkentenis, dat het opsonine de mikro-organismen niet behoeft te dooden doch ze slechts geschikt maakt voor de opname in leukocyten, bevestigt ten volle Metchnikoff's stelling, dat de definitieve vernietiging der mikroben *in vivo* in verreweg de meeste gevallen eerst *in* de phagocyten tot stand komt. Voorts wijst ook het niet bestaan van parallellisme tusschen natuurlijke immuniteit eenerzijds, en amboceptorengehalte van het serum benevens het vermogen tot spontane opsonineproductie der leukocyten anderzijds erop, dat eerst *in* de phagocyten de beslissende strijd om het behoud van het makroorganisme wordt gestreden.

1) Hiermede is natuurlijk niet implicite gezegd, dat er naast de mobiele leukocyten geen andere cellen tot complement- en opsonineproductie in staat zouden zijn.

De experimenteele identificatie van opsonine en lysine brengt de zoozeer gewenschte eenheid in onze theoretische opvattingen omtrent aangeboren en verworven immuniteit. De erkenenis, dat de leukocyten in staat zijn het opsonine zelve te produceeren, kan slechts hunne beteekenis doen toenemen, terwijl ten slotte de spontaanphagocytose in vitro ons leert, dat phagocyten zonder eenige extracellulaire hulp mikrogen vermogen op te nemen en te digereeren — alles binnen zekere grenzen van virulentie. Zoodra deze in het spel komt — en dat is eigenlijk overal waar pathogene mikrogen zich in het dierlijk lichaam bevinden en vermeerderen — dan hebben wij ook met het aandeel der humores rekening te houden. Dan verrichten deze met de phagocyten samen het werk. Ik meen dan ook aan de grondslagen der phagocytaire immuniteitstheorie in het minst niet te kort te doen, wanneer ik besluit met de door mij als motto gekozen uitspraak van Denys en Leclef: „Dans une étude sur l'immunité, il importe de tenir compte de deux facteurs: les humeurs et les leucocytes. Dans le corps de l'animal, ces deux facteurs ne sont jamais séparés.”

LITTERATUUR.

1. Nuttall, *Zeitschr. f. Hyg. und Inf. Krankh.*, IV, 1888, p. 353.
2. Wright, *Lancet*, 1 Dec. 1900, 2 Mrt. en 1 Juni '01.
3. Lubarsch, *Centralbl. f. Bakt.*, Bd. VI.
4. Wright and Windsor, *Journ. of Hyg.*, Vol. II, No. 4, Oct. '02.
5. Bulloch, *Brit. Med. Journ.*, 10 Sept. '04.
6. Leishman, *Brit. Med. Journ.*, 11 Jan. '02.
7. Wright and Douglas, *Proceed. Roy. Soc.*, Vol. 72, p. 357, 1 Sept. '03.
8. Wright, *Lancet*, 29 Mrt. '02.
9. Wright and Douglas, *Proc. Roy. Soc.*, Vol. 73, p. 128, 11 Jan. '04.
10. Wright and Douglas, *ibidem*, Vol. 74, p. 147, 26 Juli '04.
11. Wright and Douglas, *ibidem*, Vol. 74, p. 159, 26 Juli '04.
12. Wright and Reid, *ibidem*, Vol. 77, p. 194, 23 Nov. '05.
13. Wright, *Kurze Abhandlung über Anti-typhus-inokulationen*, Jena 1906.
14. Neufeld und Rimpau, *Deutsche Mediz. Wochenschr.*, 29 Sept. '04, No. 40.
15. Denys et Leclef, *La Cellule*, 1895.
16. Gabritchewsky, *Ann. Pasteur*, 1894.
17. Denys et Marchand, *Bull. de l'Acad. roy. de méd. de Belgique*, 1896, p. 249.
18. Mennes, *Z.schr. f. Hyg. u. Inf. Krankh.*, Bd. XXV, 1897, S. 413.
19. Neufeld und Rimpau, *Z.schr. f. Hyg. u. Inf. Krankh.*, Bd. LI, 1905, S. 283.
20. Neufeld und Töpfer, *Centralbl. f. Bakt.*, Bd. XXXVIII, Orig. S. 456.
21. Neufeld und Hüne, *Arb. a. d. Kaiserl. Gesundh. Amte*, Bd. XXV, H. 1.
22. Wright, *Deutsche Mediz. Wochenschr.*, 1904. No. 52.
23. Wright and Reid, *Proc. Roy. Soc.*, Vol. 77, p. 211, 23 Nov. '05.
24. Wright and Lamb, *Lancet*, 23 Dec. 1899.
25. Bulloch and Atkin, *Proc. Roy. Soc.*, Vol. 74, p. 379.
26. Hektoen and Ruediger, *Journ. of infect. diseases*, Vol. II, No. 1, 1905.
27. Bächer, *Z.schr. f. Hyg. u. Inf. Krankh.*, Bd. LVI, 1907.
28. Besredka, *Ann. Pasteur*, 1901.
29. Dean, *Proc. Roy. Soc.*, Vol. 76. p. 506, 1905.

30. Wright, *Lancet*, 5 Juli '02.
31. Löhlein, *Ann. Pasteur*, 1905, No. 10.
32. Löhlein, *ibidem*, 1906, No. 11.
33. Neumann, *Centralbl. f. Bakt.*, Bd. XLIV, p. 46, 1907.
34. Havet, *la Cellule*, X, 1894, p. 245.
35. Bordet, *Ann. Pasteur*, 1896, p. 104.
36. Marchand, *Arch. de Médic. expér.*, X, 1898, p. 253.
37. Stiennon, *C. R. de la Soc. de Biol.*, 13 et 20 Avril 1907.
38. Hektoen, *Centralbl. f. Bakt.*, Bd. XLIV, Orig. Heft. 5.
39. Levaditi et Inman, *C. R. Soc. de Biol.*, 26 Avril 1907.
40. Dez., *ibid.*, 3 Mai '07.
41. Dez., *ibid.*, 10 Mai '07.
42. Dez., *ibid.*, 17 Mai '07.
43. Levaditi et Koessler, *ibid.*, 26 Avril '07.
44. Jousset, *Bulletin Médical*, 15 et 18 Mai 1907.
45. Hamburger en Hekma, Kon. Acad. v. Wetensch. te A'dam, *Versl. Wis- en Natuurk. Afd.*, 29 Juni '07 en *Ned. Tijdschr. v. Geneesk.*, 21 Dec. 1907.
46. Sleeswijk, *Ann. Pasteur*, Dec. 1907.
47. Malvoz, *Ann. Pasteur*, 1902, p. 625.
48. Muir and Martin, *Brit. Med. Journ.*, 22 Dec. 1906.
49. Dean, *Proc. Roy. Soc.*, Vol. 79, p. 399, 1907.
50. Noguchi, *Journ. of exper. Medic.*, IX, No. 4, 1907.
51. Ehrlich und Sachs, *Berl. Klin. Wochenschr.*, 1902, No. 21.
52. Sachs und Bauer, *Arb. a. d. Kön. Inst. f. exp. Ther.*, H. 3, 1907.
53. Bordet et Gay, *Ann. Pasteur*, Juin 1906.
54. Ledingham, *Proc. Roy. Soc.*, 13 Juni 1907.
55. Pettersson, *Centralbl. f. Bakt.*, Bd. 39, en *Z. schr. f. Klin. Med.*, Bd. 63.
56. Ottolenghi, *Münch. Med. Wochenschr.*, 1907, No. 17.
57. Savtchenko, *Ann. Pasteur*, 1902, p. 106.
58. Preisz, *Centralbl. f. Bakt.*, Bd. 44, Orig. pag. 209, 1907.
59. Wakelin Barratt, *Proc. Roy. Soc.*, Vol. 76, p. 524, 1905.
60. Dez., *ibidem*, Vol. 79, p. 1, 1907.
61. Dez., *Centralbl. f. Bakt.*, Bd. 43, p. 838, '07.
62. Keith, *Proc. Roy. Soc.*, Vol. 77, p. 537, 1906.
63. Neufeld und Bickel, *Arb. a. d. Kaiserl. Gesundh. Amte*, Bd. 27, H. 2.
64. Töpfer und Jaffé, *Zeitschr. f. Hyg. u. Inf. Krankh.*, Bd. 52, S. 393.
65. Bulloch and Western, *Proc. Roy. Soc.*, Vol. 77, p. 531, 1906.
66. Friedberger, *Kolle und Wasserman's Handbuch*, IV, 1, S. 546.
67. Dopter, *Ann. Pasteur*, 1905, No. 12.
68. Besredka, *Ann. Pasteur*, T. 18, 1904, p. 363.
69. Eysbroek, Kon. Acad. v. Wetensch. te A'dam, *Versl. Wis- en Natuurk. afd.*, 29 Sept. 1906.

70. Gengou, *Berl. Klin. Wochenschr.*, 26 Nov. 1906.
 71. Van Calcar, *Progressus rei botanicae*, Bd. I, 1907.
 72. Sobernheim, *Sitzungsber. der freien Verein. f. Mikrobiol., Centralbl. f. Bakt.*, 1906, Beiheft, S. 114.
 73. Sauerbeck, *Lubarsch-Ostertag's Ergebnisse*, XI, Abt. 1, Wiesbaden 1907.
 74. Metchnikoff, *ibidem*.
 75. Ruediger and Davis, *Journ. of inf. dis.*, IV, 1907.
 76. Lachtchenko, *Arch. f. Hyg.*, Bd. 37, p. 290.
 77. Trommsdorf, *ibidem*, Bd. 40, p. 382.
 78. Metchnikoff, *Lancet*, 2 en 9 Juni 1906.
 79. Bordet, *Ann. Pasteur*, Juni 1895.
 80. Dez., *ibid.*, 1896, p. 104.
 81. Dez., *ibid.*, 1896, p. 193.
 82. Gengou, *Ann. Pasteur*, 1901, p. 232.
 83. Levaditi, *ibid.*, 1901, p. 894.
 84. Wadoux, *C. R. Soc. de Biol.*, Nov. 1907.
 85. Löhlein, *Sitz.ber. der freien Verein. f. Mikrobiol., C.tr.bl. f. Bakt.*, 1906, Beiheft, p. 32.
 86. Bordet, *Rede gehouden te Amsterdam voor de Vereeniging Sect. v. Wetensch. Arb.*, 21 Mei 1906.
 87. Gruber und Futaki, *Münch. med. Wochenschr.*, 1907, No. 6.
 88. Ribbert, *Die pathol. Anat. u. Heilung d. durch den Staph. pyog. aur. hervorgeruf. Erkrankungen*, Bonn, 1891.
 89. Ruziczka, zie Gruber, *Wien. klin. Wochenschr.*, 1 Oct. '03.
 90. Moxter, *Deutsche med. Wochenschr.*, 19 Oct. 1899.
 91. Metchnikoff, *Rede gehouden te Amsterdam voor de Vereen. Secties voor Wetenschappelijken Arbeid*, 12 Nov. 1904.
 92. Alex. Klein, *Ctr.bl. f. Bakt.*, 1899, Bd. XXV, en *Ned. Tijdschr. v. Geneesk.*, 1899, Dl. II, p. 737.
 93. Hehewerth, *Dissertatie*, Amsterdam, 1900.
 94. Mc. Farland, *Journ. Amer. Med. Assoc.* XLIV, p. 1176.
 95. Boland, *Dissertatie*, Amsterdam, 1902.
 96. Broers, *Ned. Tijdschr. v. Geneesk.*, 29 Juni 1907.
 97. James, *Scientific Memoirs by officers of the Medical and Sanitary department, Government of India*, 1902, No. 2, *Malaria in India*, p. 7.
 98. Axamit und Tsuda, *Wien. Klin. Wochenschr.*, 1907, No. 35.
-





